



**DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE, ALIMENTARI E  
AGRO-AMBIENTALI**

**CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN  
PRODUZIONE AGROALIMENTARI E GESTIONE  
DELL'AGROECOSISTEMA  
CURRICULUM  
AGRICOLTURA BIOLOGICA**

**PRODUZIONE DI COMPOSTI FENOLICI E CAPACITÀ  
ANTIOSSIDANTE IN DUE CULTIVAR DI LACTUCA SATIVA  
CRESCIUTE IN CONDIZIONI AMBIENTALI ALTERATE.**

**Relatore**

Prof. Mike Frank Quartacci

**Correlatore**

Prof. Alberto Pardossi

**Candidato**

Francesco Micaelli

**ANNO ACCADEMICO 2014-2015**

## **INDICE**

### **CAPITOLO 1 - I composti fenolici nelle piante**

**pag. 5**

1.1 - Composti fenolici

pag. 6

1.1.1 - Acidi fenolici

pag. 9

1.1.2 - Flavonoidi

pag. 10

1.1.3 - Antocianine

pag. 11

### **CAPITOLO 2 - La lattuga**

**pag. 16**

2.1 - Notizie generali

pag. 16

2.2 - Coltivazione

pag. 17

2.3 - Difficoltà colturali

pag. 18

2.4 - Produzione

pag. 19

### **CAPITOLO 3 - Proprietà antiossidanti di acidi fenolici e flavonoidi**

**pag. 21**

### **CAPITOLO 4 - Studi predefiniti su *Lactuca sativa* L.**

**pag. 23**

### **CAPITOLO 5 - Scopo dello studio**

**pag. 30**

## **CAPITOLO 6 - Materiali e metodi**

**pag. 31**

6.1 - Estrazione dei campioni per le analisi

pag. 33

6.2 - Analisi dei flavonoidi

pag. 34

6.3 - Analisi delle antocianine

pag. 34

6.4 - Analisi degli acidi fenolici liberi

pag. 35

6.5 - Analisi degli acidi fenolici coniugati

pag. 35

6.6 - Analisi dell'attività antiossidante totale

pag. 36

6.7 - Fenoli totali

pag.36

## **CAPITOLO 7 - Risultati**

**pag. 38**

7.1 - Crescita

pag. 38

7.2 - Acidi fenolici liberi e coniugati totali

pag. 39

7.3 - Flavonoidi totali

pag. 42

7.4 - Antocianine totali

pag. 43

7.5 - Fenoli totali

pag. 44

7.6 - TEAC totale

pag. 46

7.7 - Acidi fenolici liberi

pag. 47

7.8 - Acidi fenolici coniugati

pag. 50

7.9 - Flavonoidi

pag. 54

## **CAPITOLO 8 - Discussione**

**pag. 59**

8.1 - Effetti della salinità

pag. 59

8.2 - Effetti dell'intensità luminosa

pag. 64

8.3 - Effetti del biossido di carbonio

pag. 69

8.4 - Effetti della salinità e del biossido di carbonio

pag. 74

8.5 - Effetti dell'intensità luminosa e del biossido di carbonio

pag. 76

## **CAPITOLO 9 - Conclusioni**

**pag. 78**

## **Bibliografia**

**pag. 80**

## CAPITOLO 1

### **I composti fenolici nelle piante**

Le piante producono un'ampia e diversificata gamma di composti organici che in apparenza non possiedono una funzione direttamente connessa con la loro crescita e il loro sviluppo. A tutta questa categoria di sostanze si attribuisce la classificazione generale di metaboliti secondari. Come appena accennato, questa denominazione è motivata dalla constatazione che, rispetto a quelle sostanze definite metaboliti primari come i lipidi, gli amminoacidi, i nucleotidi o i carboidrati semplici, a tali composti non è stata riconosciuta ancora una funzione nei processi assimilativi, respiratori, di trasporto e differenziamento. Questi metaboliti presentano la particolarità di essere un gruppo di sostanze presenti esclusivamente nel regno vegetale, diversamente da quanto avviene per l'altra categoria e inoltre, all'interno dello stesso regno vegetale, essi presentano una distribuzione talvolta molto specifica. Per diverso tempo il significato adattativo dei metaboliti secondari vegetali è rimasto sconosciuto. Tra le prime ipotesi, quella secondo cui essi sarebbero stati prodotti finali di processi metabolici, privi di funzione ovvero sostanze di scarto metaboliche. Studi successivi hanno dimostrato come queste sostanze in realtà svolgano alcune importanti funzioni metaboliche nelle piante:

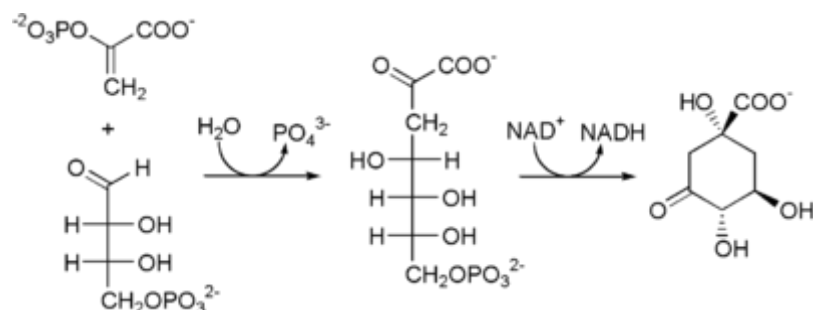
- proteggono gli organismi vegetali dall'essere oggetto di consumo da parte di predatori primari e da infezioni da parte di patogeni microbici;
- sono utili per l'effetto attrattivo operato sugli impollinatori e su tutti gli animali in grado di disperdere i frutti;
- hanno funzioni come agenti di competizione nelle interazioni tra pianta e pianta e nelle simbiosi pianta-microrganismo.

I metaboliti secondari possono essere suddivisi in tre classi differenti dal punto di vista chimico: terpeni, fenoli e composti contenenti azoto. Il presente lavoro si focalizza sulla seconda classe di composti.

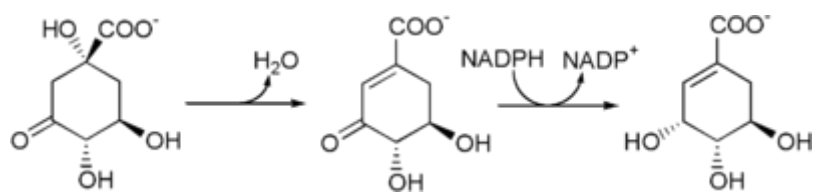
## 1.1 - Composti fenolici

Le piante producono una grande varietà di composti secondari aventi al loro interno un gruppo fenolico, ovvero un anello aromatico con legato un residuo ossidrilico. Tutte queste sostanze sono definite fenoli. Nel regno vegetale questa categoria di composti è rappresentata da un insieme eterogeneo dal punto di vista della natura chimica e include circa 10.000 molecole con diverse proprietà: certe sono solubili solamente in solventi organici, altri consistono in acidi carbossilici e glicosidi idrosolubili, altri ancora sono grandi polimeri insolubili. In conformità a queste caratteristiche essi possiedono funzioni diverse nella pianta. A riprova dell'eterogeneità di questa famiglia di composti sta il fatto che sono sintetizzati seguendo diversi percorsi metabolici. Principalmente sono seguite due vie biosintetiche: la via dell'acido scichimico e la via dell'acido malonico. Nelle piante superiori il primo percorso è quello che mostra una maggiore importanza, determinando in tal modo la biosintesi più cospicua di fenoli. In estrema sintesi si può riportare che tale via metabolica attinge il proprio materiale dalla glicolisi e dalla via ossidativa dei pentoso fosfati, rispettivamente l'acido fosfoenolpiruvico dall'una e l'eritrosio-4-fosfato dall'altra, e porta alla formazione di amminoacidi aromatici. Il nome dell'intero processo deriva da uno degli intermedi di reazione, l'acido scichimico. La maggior parte dei composti fenolici vegetali deriva dall'amminoacido aromatico fenilalanina che subisce la perdita di un residuo ammoniacale, con formazione di acido *trans*-cinnamico. Tale reazione è catalizzata dall'enzima cardine del metabolismo secondario, la fenilalanina ammoniacale liasi (PAL) (fig. 1). La sua attività è incrementata da alcune particolari condizioni ambientali come: bassa concentrazione di nutrienti, luce e infezioni fungine. Reazioni successive prevedono l'aggiunta di più gruppi ossidrilici e altri sostituenti.

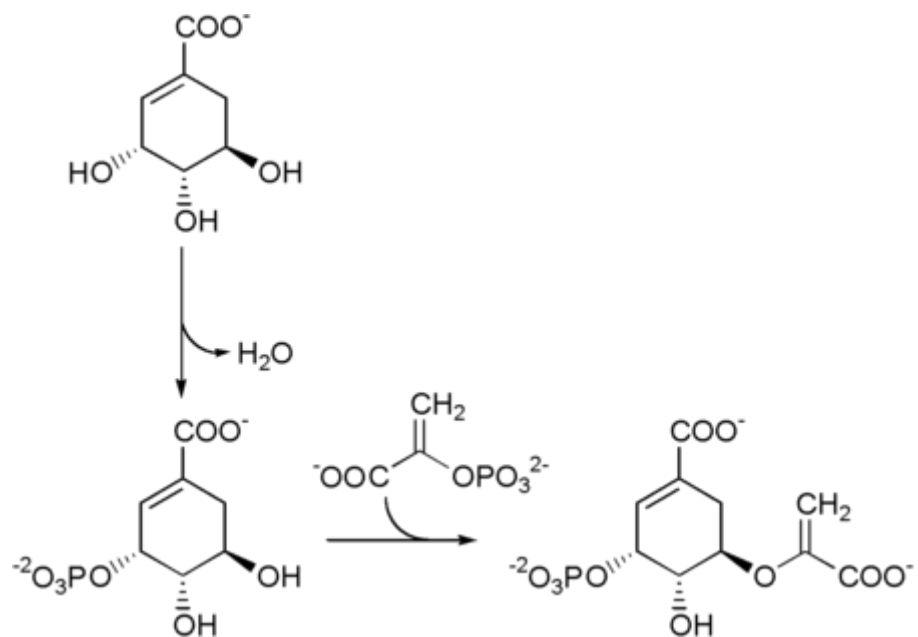
Figura 1 - Principali passaggi biochimici che portano alla formazione dell'amminoacido aromatico fenilalanina a partire da prodotti di altri processi metabolici e formazione di acido trans-cinnamico a partire da fenilalanina ad opera dell'enzima PAL.



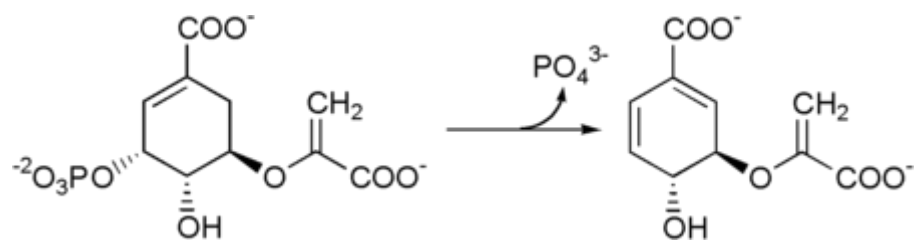
Il fosfoenolpiruvato e l'eritrosio-4-fosfato reagiscono formando 3-deossi-arabinoeptulsonato-7-fosfato (DAHP), in una reazione catalizzata dall'enzima DAHP sintasi. Il DAHP viene quindi trasformato in 3-deidrochinato (DHQ), in una reazione catalizzata da DHQ sintasi. La reazione richiede come cofattore NAD, il quale però, contrariamente a quanto mostrato nello schema sottostante, sarà successivamente rigenerato.



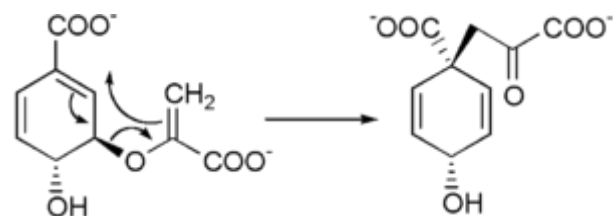
Il 3-deidrochinato viene disidratato a 3-deidroscichimato dall'enzima deidrochinasi, successivamente il deidroscichimato viene ridotto ad acido scichimico dall'enzima scichimato deidrogenasi, che utilizza NADPH quale cofattore.



Scichimate  $\rightarrow$  scichimate-3-fosfato  $\rightarrow$  5-enolpiruvilschimate-3-fosfato.

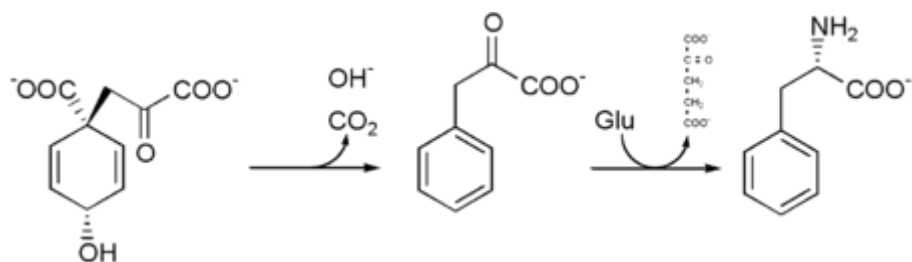


La corismato sintasi è l'enzima che catalizza la reazione da 5-enolpiruvilschimate-3-fosfato a corismato.

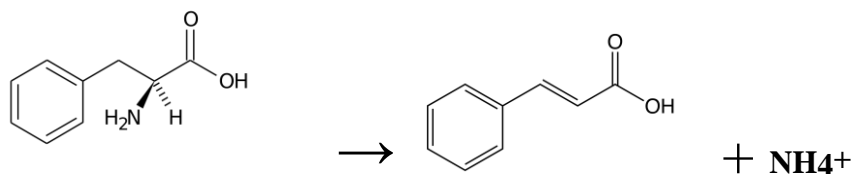


Il prefenato è biosintetizzato mediante una trasposizione di Claisen del corismato





Il prefenato è decarbossilato con perdita dell'ossidrile per formare fenilpiruvato. Questo subisce transaminazione a fenilalanina, con il glutammato come donatore del gruppo amminico.



Reazione di formazione dell'acido cinnamico catalizzata dalla fenilalanina-ammonio liasi

### 1.1.1 - Acidi fenolici

Sono composti della classe dei fenoli che contengono almeno un gruppo ossidrilico e un gruppo carbossilico. Si possono distinguere in due differenti categorie in base alla provenienza:

-acidi idrossibenzoici: derivanti dall'acido benzoico

-acidi idrossicinnamici: derivanti dall'acido cinnamico

Tra i composti che nel presente lavoro sono stati identificati (fig. 2), alla prima categoria appartengono gli acidi: gallico, protocatecuico, *p*-idrossibenzoico, vanillico e siringico; della seconda fanno invece parte gli acidi: caffeico, cumarico e ferulico. Altri due composti fondamentali identificati nel presente lavoro sono gli acidi clorogenico e cicorico che costituiscono, rispettivamente, l'estere dell'acido caffeico con l'acido chinico e l'estere dell'acido caffeico con l'acido tartarico.

Questi composti sono cruciali per la crescita della pianta e la riproduzione e sono prodotti come risposta verso fattori ambientali avversi (alta intensità luminosa, basse temperature, inquinamento, ecc.) e per la difesa (Valentine et al., 2003). Esistono numerosi studi che mostrano l'effetto degli stress ambientali sulla composizione di acidi fenolici delle piante insieme ad altri che

riportano risultati sull'azione dei sopracitati fattori di stress sull'accumulo di composti antiossidanti. Pennycooke et al. (2005) riportano che l'esposizione a basse temperature era la causa dell'incremento di fenoli totali e della capacità antiossidante in petunia. Risultati di altre ricerche più recenti hanno messo in luce come gli acidi fenolici siano universalmente distribuiti nelle piante (Elzaweely et al., 2007; Dai e Mumper, 2010). Come in precedenza descritto, gli acidi fenolici sono composti che formano un gruppo variegato che include acidi idrossibenzoici e idrossicinnamici. I derivati dell'acido cinnamico sono frequentemente prodotti come semplici esteri con molecole di glucosio o acidi carbossilici. Inoltre, gli acidi fenolici possono essere presenti nelle piante sotto forma di glicosidi o esteri con altri composti naturali quali steroli, alcoli, glucosidi e acidi idrossilipidici.

#### 1.1.2 - Flavonoidi

La forma molecolare di questa importante classe di composti fenolici è costituita da 15 atomi di carbonio disposti in una molecola strutturata con due anelli aromatici legati da un ponte a tre atomi di carbonio. Tale conformazione deriva da due vie biosintetiche, quella dell'acido scichimico e quella dell'acido malonico. Sono classificati in categorie differenti basate sul livello di ossidazione del ponte a tre atomi di carbonio. Ai fini del presente lavoro i gruppi di maggiore interesse risultano essere quelli dei flavonoli, dei flavoni e delle antocianine, oltre ad alcune loro forme glicosilate. Nello specifico sono stati identificati tre composti del gruppo dei flavonoli (quercetina, campferolo e miricetina), uno di quello dei flavoni (luteolina) e uno delle antocianine (fig. 3). Altre categorie di flavonoidi sono costituite dai flavanoni (naringenina), i flavan-3-oli (catechine ed epicatechine), gli isoflavoni insieme ad un'altra serie di composti come auron, xantani e tannini condensati. Per la precisione sono stati riconosciuti e isolati circa 6.000 composti appartenenti a questa classe e molti di essi sono diffusi nelle piante superiori (Tolonen et al., 2002; Austin e Noel, 2003). Molti flavonoidi che sono accumulati nei vacuoli delle cellule vegetali si presentano sotto forma di glicosidi. Essi possono essere sia legati al carbonio che all'ossigeno. L'elemento variabile dei composti di questa categoria consiste nel numero di posizioni sulla molecola in cui può avvenire la

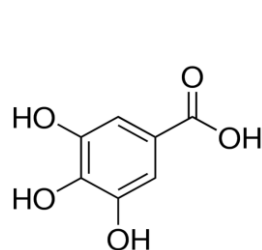
glicosilazione, il livello di glicosilazione e la tipologia di zuccheri coinvolti. In aggiunta, tra le varie centinaia di agliconi isolati dalle piante solamente otto sono ampiamente diffusi (Seigler, 1998).

### 1.1.3 - Antocianine

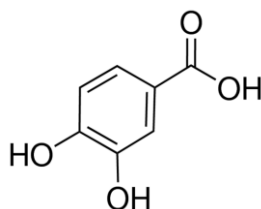
Sono una classe di pigmenti idrosolubili appartenente alla famiglia dei flavonoidi. Costituiscono uno tra i più importanti gruppi di pigmenti nei vegetali e si riscontrano nei fiori e nei frutti così come in arbusti e foglie nel periodo autunnale. Il loro colore può variare dal rosso al blu in dipendenza dal pH del mezzo in cui si trovano e dalla formazione di sali con metalli presenti nei tessuti. Questi composti sono presenti, con diverse quantità, in quasi tutte le piante superiori. Si rintracciano specialmente nei frutti e nelle infiorescenze e si possono rilevare su foglie e radici, spesso in unione ad altri pigmenti come carotenoidi e flavonoidi. Insieme sono alla base della colorazione delle foglie nella stagione autunnale. Le antocianine svolgono una funzione importante anche in piante giovani o con getti nuovi, proteggendole dai raggi ultravioletti nel momento in cui ancora non è iniziata la produzione di clorofilla e cere. A questo punto l'intera pianta può assumere una colorazione rosso-brunastra che si riduce mano a mano che la produzione di clorofilla prende avvio. Esse svolgono diversi compiti. Grazie al loro potere antiossidante proteggono le piante dai danni causati dalle radiazioni UV, assorbendo luce di una determinata lunghezza d'onda. Infatti, in caso di esposizione a grandi quantità di radiazioni UV la loro sintesi incrementa per rispondere a questa causa di stress. A causa dei loro colori, tali pigmenti sono in grado di attrarre insetti e animali, fornendo in tal modo un aiuto per la riproduzione delle piante e il trasporto dei semi. Inoltre, sono capaci di assorbire la luce blu-verde e questo è stato dimostrato essere una risposta protettiva per piante esposte a elevata illuminazione in combinazione con condizioni di siccità e basse temperature. Le antocianine sono formate da una molecola di benzene unita a una di pirano, collegata a sua volta con un gruppo fenilico connesso con diversi sostituenti. Questa molecola complessa prende il nome di catione flavilio e rappresenta la struttura di base di tutte le antocianine. Esse derivano dai rispettivi agliconi, le antocianidine dalle quali differiscono per l'aggiunta di un gruppo glicosidico,

normalmente in posizione R3 o R4. In natura sono stati riscontrati circa una ventina di agliconi, mentre il numero di derivati è all'incirca 15-20 volte superiore. Tra i primi, i più frequenti in natura sono: delphinidina, petunidina, cianidina, peonidina e pelargonidina. Questi pigmenti sono sintetizzati da due vie metaboliche distinte a partire da acido acetico. Il primo percorso passa attraverso la produzione dell'amminoacido fenilalanina, mentre l'altro conduce alla formazione di malonil-CoA. I prodotti di queste vie sintetiche vengono dunque assemblati insieme per portare alla formazione dei diversi agliconi, i quali a loro volta sono stabilizzati mediante aggiunta di vari gruppi glicosidici. Nel presente lavoro, oggetto di studio è stata la cianidina e il suo rispettivo glicoside (fig. 4).

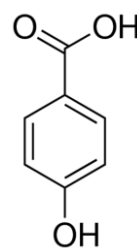
Figura 2 - Acidi fenolici.



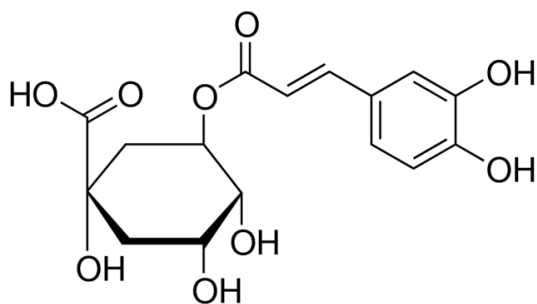
ac. gallico



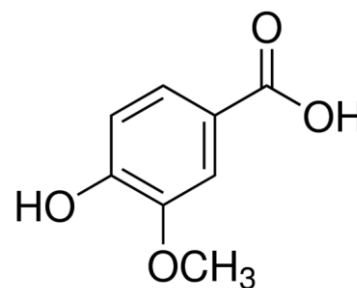
ac. protocatecuico



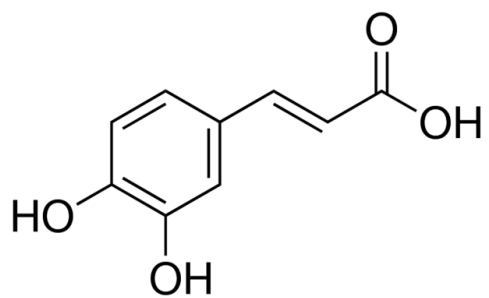
ac. p-idrossibenzoico



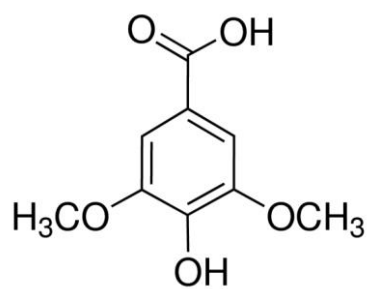
ac. clorogenico



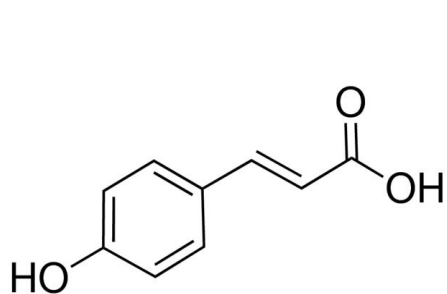
ac. vanillico



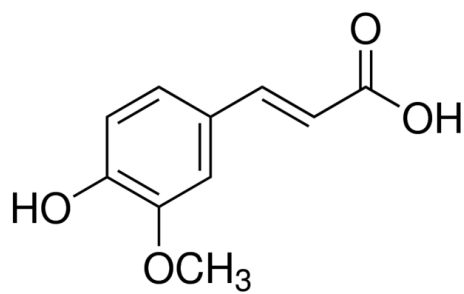
ac. caffeico



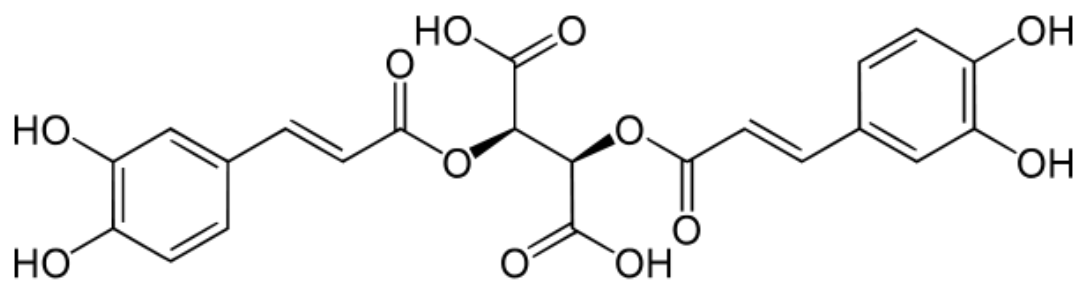
ac. sirigico



ac. cumarico

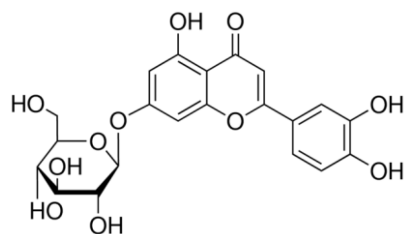


ac. ferulico

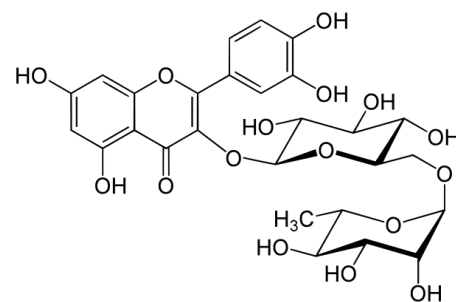


ac. cicorico

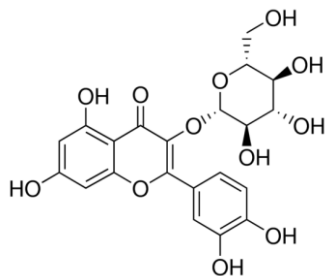
Figura 3 - Flavonoidi.



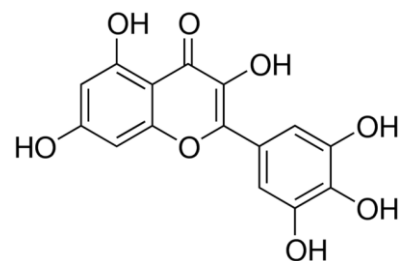
luteolina-7-O-glucoside



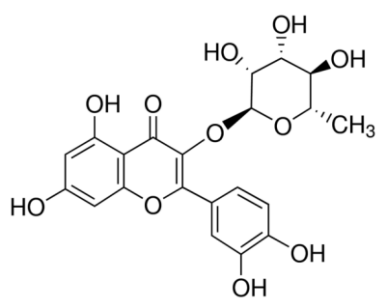
rutina



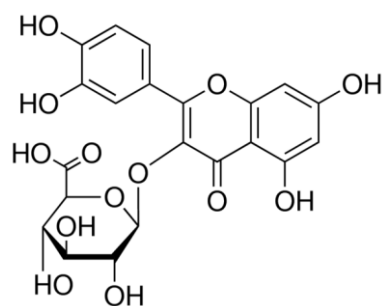
quercetina-3-O-glucoside



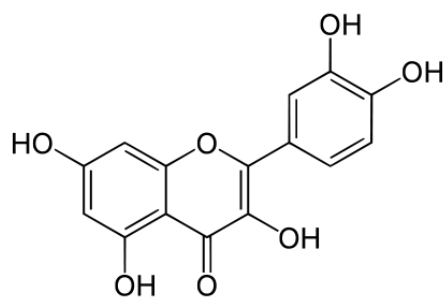
miricetina



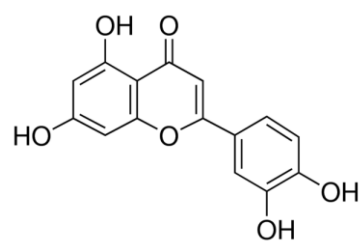
quercitrina



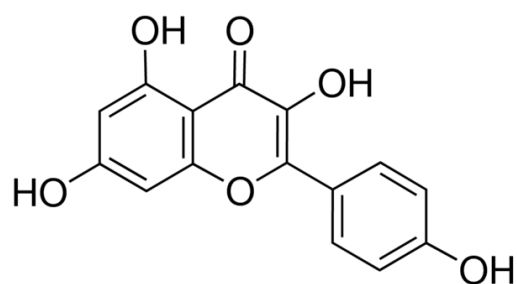
quercetina-3-O-glucuronide



quercetina

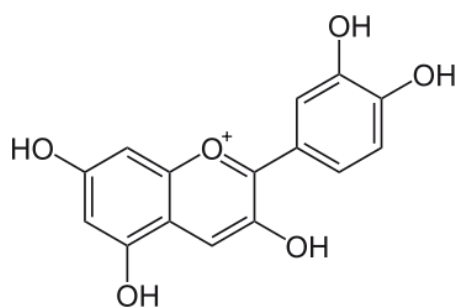


luteolina

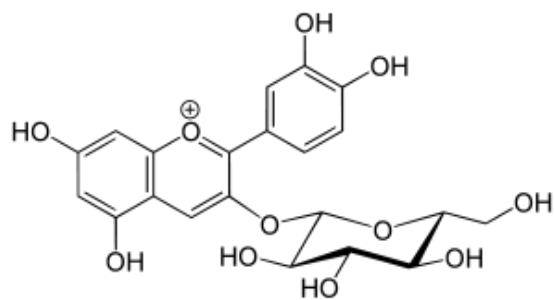


campferolo

Figura 4 - Antocianine.



cianidina



cianidina-3-O-glucoside

## CAPITOLO 2

### **La lattuga**

#### 2.1 - Notizie generali

La lattuga (*Lactuca sativa* L.) è una angiosperma appartenente alla famiglia delle Asteraceae. È principalmente e quasi esclusivamente coltivata come ortaggio da foglia, ma in certi casi anche per i suoi steli e i suoi semi. La lattuga è stata coltivata per la prima volta dagli Egizi, che la riconvertirono da specie erbacea - i cui semi erano utilizzati per produrre olio - in una coltura a scopo alimentare coltivata per le sue foglie succulente in aggiunta ai suoi semi ricchi di olio. Questa specie si diffuse in seguito tra i Greci e i Romani e questi ultimi le attribuirono il nome “lactuca” dal quale sono derivati il termine italiano “lattuga” e il corrispondente termine inglese “lettuce”.

Intorno al 50 d.C. erano descritti diversi tipi di questa coltura e successivamente la lattuga appare citata in numerosi testi di epoca medioevale, compresi numerosi erbari. Tra il XVI e il XVIII secolo in Europa si è assistito allo sviluppo di molte varietà e intorno alla metà del 1700 erano descritte alcune cultivar che sono ancora adesso rintracciabili negli orti. L'Europa e il Nord America originariamente dominavano il mercato di questo ortaggio, ma verso la fine del Novecento il consumo di lattuga si è diffuso in tutto il mondo. Generalmente coltivata come specie annuale, la lattuga è cresciuta con facilità sebbene necessiti di temperature relativamente basse per salvaguardarla da una rapida entrata in fioritura. La sua coltivazione può essere minacciata da varie carenze nutritive, da insetti ed erbivori, oltre che da malattie fungine e batteriche. *L. sativa* si incrocia senza difficoltà con la propria specie e con altre appartenenti allo stesso genere; sebbene questo aspetto possa costituire un problema per gli orticoltori domestici che tentano di conservare la purezza dei semi, i biologi hanno utilizzato questa capacità per espandere il pool genetico delle varietà coltivate di lattuga.

La produzione mondiale di lattuga e cicoria, con riferimento all'annata 2010, si è attestata su 23.620.000 tonnellate, metà delle quali provenienti dalla Cina. La



lattuga è molto spesso utilizzata per insalate, sebbene sia anche annoverata nella preparazione di altre pietanze come le zuppe, i panini e le focacce ripiene; inoltre, può essere grigliata. Una particolare varietà, la Woju o lattuga asparago, è coltivata per i suoi steli che possono essere consumati crudi o cotti. La lattuga è una ricca fonte di vitamine A e K ed è una modesta apportatrice di ferro e folati. La coltura, quando contaminata, è spesso origine della diffusione di infezioni batteriche, virali o parassitiche nell'uomo, tra le quali si possono citare *l'Escherichia coli* e la *Salmonella* spp.

## 2.2 - Coltivazione

Specie principalmente annuale, annovera alcune varietà che possono essere fatte svernare anche in climi relativamente freddi servendosi di una copertura pacciamante in paglia. Le più antiche varietà tradizionali sono spesso coltivate in letti freddi. Le lattughe destinate al taglio delle singole foglie sono generalmente piantate in modo diretto nell'orto in file strette. Le varietà che formano il cappuccio sono comunemente seminate in vasche e successivamente trapiantate in campo (20-35 cm di distanza) dopo la formazione di alcune foglie. Le lattughe trapiantate a distanze maggiori e perciò con più spazio a disposizione ricevono più radiazione solare, aspetto che migliora il colore e le quantità di nutrienti nei tessuti fogliari. Lattughe con parti chiare o bianche contengono scarse quantità di elementi nutritivi, come ad esempio le costole di alcune lattughe tipo iceberg. Questa specie si sviluppa in modo migliore sotto piena illuminazione solare, in suoli sciolti e ricchi di azoto e con valori di pH compresi tra 6 e 6,8. Il calore generalmente stimola le lattughe a entrare in fioritura e molte varietà crescono scarsamente sopra i 24°C. Temperature più fredde determinano una migliore resa con valori ottimali tra 16 e 18°C. Temperature superiori a 27°C solitamente determinano una scarsa o nulla germinazione dei semi. Dopo raccolta la lattuga si conserva più a lungo quando mantenuta a 0°C e con il 96% di umidità. La coltura si degrada rapidamente quando è conservata insieme a frutta come mele, pere e banane che rilasciano l'agente gassoso della maturazione, l'etilene. L'alto contenuto di acqua della specie (95,63%) crea problemi nei sistemi di conservazione della pianta che, infatti, non può essere congelata con successo,

inscatolata o essiccata, ma deve essere consumata fresca. Considerando la facilità con cui le lattughe si incrociano tra loro, è necessario disporle con spaziature comprese tra gli 1,5 e i 6 cm tra le diverse varietà, se si deve conservare il seme. La coltura è incrociata anche con *L. serriola*, una specie selvatica, dando come prodotto semi che a loro volta originano spesso piante con foglie di consistenza dura e di sapore amaro. Questa propensione per l'esoincrocio ha guidato diversi programmi di produzione che hanno utilizzato specie del genere *Lactuca* strettamente correlate tra loro, come ad esempio *L. serriola*, *L. virosa* ed *L. saligna*, allo scopo di ampliare il pool genetico disponibile. I semi si mantengono in modo più idoneo quando sono conservati a basse temperature e, sempre che non siano trattati criogenicamente, si mantengono vitali più a lungo se conservati a -20°C. Nella conservazione hanno vita relativamente breve.

### 2.3 - Difficoltà colturali

Carenze nutritive nel suolo possono provocare problemi che spaziano dalla malformazione della pianta alla mancanza di crescita del cespo. Molti organismi invertebrati sono attratti dalla lattuga, compresi gli agrotidi che tagliano le piantine al livello del suolo, gli elateridi e i nematodi che rendono le piante gialle e stentate, gli afidi che macchiano le piante e determinano l'ingiallimento delle foglie e la loro distorsione, le cavallette che causano difficoltà nella crescita e ingiallimento fogliare, i tripidi che rendono le foglie grigio-verdi o argentate, le larve minerarie che scavano gallerie all'interno delle foglie, le pulci che producono piccoli fori sul tessuto fogliare e i bruchi che insieme a chioccioline e lumache provocano forature più consistenti sulle medesime parti. La lattuga, da parte sua, contiene diversi composti con funzione di difesa compresi lattoni di sesquiterpeni e altri composti fenolici come flavonoidi e glicosidi che contribuiscono alla protezione contro i parassiti. Alcune varietà ne contengono più di altre e alcuni incroci selettivi e studi su modificazioni genetiche si sono concentrati sull'utilizzo di questo carattere per individuare e produrre varietà commerciali con una resistenza ai parassiti potenziata. La lattuga, inoltre, è soggetta a molte malattie di tipo virale, compreso l'ingrossamento della nervatura fogliare (causato da Big Vein Virus) che provoca ingiallimento e deformazione fogliare, il virus del mosaico

che è diffuso dagli afidi e rende stentata la crescita della pianta deformando allo stesso tempo le foglie. I giallumi dell'astro sono una malattia causata da batteri portati dalle cavallette che determinano deformazione del tessuto fogliare. Patologie di tipo fungino comprendono l'oidio e la peronospora che portano le foglie ad ammuffire e alla morte, il marciume del piede, la caduta della lattuga e la muffa grigia che conduce l'intera pianta a marcire e collassare. La semina e il trapianto eccessivamente fitti agevolano l'insorgere di malattie e l'insediamento di parassiti. Anche le erbe infestanti possono rappresentare un problema poiché la lattuga coltivata non è generalmente competitiva verso di esse, soprattutto quando è seminata direttamente in campo. Al contrario, quando è posta in campo dopo il trapianto, almeno nelle fasi iniziali, mostra maggiore competitività. Ad ogni modo con il trascorrere della stagione, se non sono osservate le opportune pratiche colturali, può essere circondata da malerbe che provocano malformazione nelle piante e un raccolto più scarso. Le erbe infestanti, inoltre, rappresentano un rifugio per i parassiti invertebrati e un ricettacolo per gli agenti eziologici delle malattie e infine possono rendere la fase di raccolta più difficoltosa.

#### 2.4 - Produzione

La lattuga è l'unico membro del genere *Lactuca* ad essere coltivato a scopo commerciale. La FAO riporta che la produzione mondiale di lattuga e cicoria (per la precisione le due colture sono computate insieme per ragioni d'indagine) per l'annata 2010 è stata di 23.620.000 tonnellate. La produzione proveniva principalmente dalla Cina (53%), dagli Stati Uniti (17%) e dall'India (4%). Nonostante la Cina sia il maggiore produttore di lattuga, la gran parte della produzione è devoluta al consumo interno. La Spagna è il più ampio esportatore al mondo di questa coltura, con gli Stati Uniti che si qualificano al secondo posto.

La maggior parte della produzione agricola è condotta con l'applicazione di grandi quantitativi di prodotti chimici, inclusi fertilizzanti ed antiparassitari; tuttavia, la produzione biologica segna una percentuale in aumento sul mercato, tendenza nata con i piccoli coltivatori, ma che si è elevata a livello industriale. Nei primi anni del XXI secolo prodotti a base di insalate imbustate hanno

cominciato ad occupare una porzione crescente del mercato della lattuga, specialmente negli Stati Uniti. Ottenuti da quello che prima era lattuga di scarto perché non reputata accettabile per il mercato fresco, questi prodotti sono impacchettati in modo tale che possono conservarsi più a lungo rispetto alla lattuga appena raccolta. Nel 2007 il 70% della produzione di lattuga negli USA proveniva dalla California; in questo Stato essa si pone al terzo posto per consumo e produzione dopo pomodori e arance.

Le varietà più comuni e coltivate sono le seguenti:

*L. sativa capitata*: tipo a cappuccio; presenta foglie tondeggianti, ondulate, leggere che formano un cespo più o meno rotondeggiante e chiuso;

*L. sativa longifolia*: tipo romano; forma foglie erette, allungate, di consistenza croccante, ripiegate a cucchiaino, con costola carnosa e rilevata, spesso formano un cespo allungato e voluminoso;

*L. sativa acephala*: tipo da taglio; le foglie sono leggere e non formano un cespo e, analogamente a colture come lo spinacio, vengono tagliate anche due o tre volte per ciclo colturale.

Le cultivar oggetto del presente lavoro, ossia il tipo a foglia verde Batavia Bionda di Parigi e quello a foglia rossa Foglia di Quercia appartengono entrambe alla varietà *L. sativa acephala*. La prima delle due è una pianta ricca di sali minerali ferrosi, vitamine ed enzimi. Ha la caratteristica di formare un cespo grosso e di essere indotta ad entrare in fioritura non molto facilmente, aspetto importante per la sua destinazione prevalente al consumo come ortaggio da foglia. Presenta un ciclo vegetativo di circa 75 giorni e dunque rientra nella categoria delle cultivar a precocità medio-tardiva. È una cultivar estivo-autunnale. L'altra, invece, si adatta ad essere coltivata sia in primavera sia in autunno. Nel primo caso rientra nella categoria dell'alta precocità, presentando un ciclo di sviluppo di circa 30 giorni; nell'altra condizione si comporta come la cultivar a foglia verde, realizzando un ciclo medio-tardivo che si conclude in circa 70 giorni complessivi.

## CAPITOLO 3

### **Proprietà antiossidanti di acidi fenolici e flavonoidi**

Lo stress ossidativo si ritiene sia sostanziale, se non cruciale nell'avvio di molte condizioni patologiche e di malattie quali stati infiammatori, patologie autoimmuni, cataratta, cancro, morbo di Parkinson, arteriosclerosi e invecchiamento (Lukyanova et al., 2007). Lo stress ossidativo gioca un ruolo anche nelle malattie cardiache, neurodegenerative, nel cancro e nei processi di invecchiamento (Zima et al., 2001; Astley, 2003). Questa teoria è supportata da prove che suggeriscono e indicano che il danno ossidativo abbia una parte nello sviluppo di patologie croniche e degenerative connesse con l'età (Atoui et al., 2005). I composti con potere antiossidante sono sostanze che si oppongono a questo e che significativamente ritardano o prevengono l'ossidazione di un substrato ossidabile quando presenti a basse concentrazioni paragonate al substrato (Lucio et al., 2009). I flavonoidi sono ben noti per la loro attività antiossidante. Molecole provviste di tale potere sono composti specifici che proteggono le cellule umane, animali e vegetali dagli effetti dannosi dei radicali liberi (ROS). Uno squilibrio tra presenza di antiossidanti e radicali liberi determina danno ossidativo che, a sua volta, comporta un danno a livello cellulare (Kukic et al., 2006). Attualmente, molti antiossidanti sono prodotti artificialmente, rientrando nella categoria degli antiossidanti sintetici. Il principale svantaggio dell'utilizzo di tali sostanze artificiali riguarda i loro effetti collaterali quando somministrati *in vivo* (Chen et al., 1992). Gli organismi vegetali sono fonte potenziale di antiossidanti dal valore inestimabile. Gli antiossidanti naturali rappresentano metaboliti secondari nelle piante (Dai e Mumper, 2010) come nel caso di acidi fenolici, flavonoidi e carotenoidi che rientrano tra i composti prodotti dalla pianta per la propria sussistenza (Apak et al., 2007). Recentemente, acidi fenolici e flavonoidi sono stati considerati come grandi antiossidanti e si è dimostrato che sono più efficaci di vitamina C, E e carotenoidi (Dai e Mumper, 2010). Le proprietà antiossidanti di queste due categorie di composti sono mediate dai seguenti meccanismi: abbattimento di forme radicaliche come le specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (RNS); soppressione della formazione di ROS e RNS con l'inibizione di alcuni enzimi e con la chelazione di metalli presenti in tracce

coinvolti nella produzione di radicali liberi; sovraregolazione o protezione del sistema di difesa antiossidante (Cotelle, 2001). La capacità riduttiva di acidi fenolici e flavonoidi è in relazione con il numero di gruppi ossidrilici liberi nella struttura molecolare che potrebbe essere rafforzata dall'ingombro sterico (Rice-Evans et al., 1996). La luteolina è un flavone che agisce come antiossidante, abbattitore di radicali liberi, agente antinfiammatorio, modulatore del sistema immunitario e agente preventivo della carcinogenesi (Seelinger et al., 2008). Flavonoidi provenienti da tè, cacao, cioccolato, frutta, verdura e vino sono composti antiossidanti molto potenti che contribuiscono a ridurre l'incidenza di ictus, infarto, diabete e cancro. I loro effetti anticarcinogenetici sono approfonditamente indagati. Oltre agli effetti positivi sul miglioramento delle condizioni di salute, gli antiossidanti sono pure addizionati ad alimenti per prevenire o ritardare l'ossidazione degli stessi, innescata da radicali liberi prodottisi durante l'esposizione a fattori ambientali come aria, luce e temperatura (Hros et al., 2000). Ghasemzadeh e Jaafar (2011) riportavano che fenoli isolati da giovani piante di ginger, compresi quercetina, campferolo, rutina e acido gallico, mostravano la capacità di contrastare la crescita di linee cellulari oncogene mammarie (MCF-7 e MDA-MB-231).

## CAPITOLO 4

### **Studi precedenti svolti su *L. sativa* L.**

*L. sativa* è stata, negli ultimi decenni, oggetto di diversi studi condotti in molti casi per indagare il contenuto in composti derivanti dal metabolismo secondario. La maggior parte di queste sostanze rientrano nella classe dei prodotti fenolici, con particolare riguardo per acidi fenolici, flavonoidi e antocianine. I diversi studi condotti avevano come obiettivi, tra gli altri, quello di comprendere se possibili divergenze nel contenuto di queste sostanze potessero essere influenzate da fattori ambientali, dunque connessi al ciclo colturale, o se invece fossero determinati da fattori intrinseci legati alla cultivar, al tipo, alla pigmentazione, ecc. L'altra faccia di questa ricerca era quella rivolta alla comprensione di quelli che potevano essere i composti principalmente dotati di potere antiossidante e quali quelli presenti a livelli relativamente elevati. A questo proposito, numerose varietà di lattuga sono state recentemente studiate e riconosciute come fonte di composti fenolici dotati di attività antiossidante (Llorach et al., 2008; Rice-Evans et al., 1995). Il valore benefico per la salute posseduto dalla lattuga è stato attribuito alla presenza di vitamina C, composti fenolici e contenuto di fibra (Nicolle et al., 2004; Nicolle e Carnat, 2004). I composti fenolici con potere antiossidante in questa specie cambiano tra le varietà a causa delle pratiche colturali, dei trattamenti e delle condizioni di conservazione (Baur et al., 2004). Attualmente, la lattuga rossa presenta un consumo più diffuso a ragione del suo contenuto in antocianine che contribuiscono al maggiore valore nutraceutico rispetto a quelle a foglia verde (Gazula et al., 2007). Mugabal et al. (2010) hanno riscontrato che estratti acquosi e metanolici di campioni di lattuga a foglia verde e a foglia rossa presentavano una capacità inibitoria nei confronti di alcuni enzimi come la lipoperossidasi (LPO) e due forme isoenzimatiche della cicloossigenasi (COX 1 e 2) e che quelli appartenenti alla varietà rossa manifestavano un maggiore potere di inibizione. Gli Autori mettevano in primo piano come la principale differenza tra cultivar verdi e rosse stesse nel loro contenuto in antocianine poiché gli estratti di queste ultime varietà mostravano una maggiore attività biologica. Questo lavoro riportava la presenza di una sola antocianina, la cianidina-3-O-(6"-malonil)-glucoside. Nella varietà a foglia

verde erano stati riscontrati composti fenolici come quercetina-3-O-glucoside e acido cicorico. L'isolamento di quercetina, acido caffeico, acido cicorico e antocianine è stato riportato da altri Autori per altre varietà di lattuga (Nicolle et al., 2004; Nicolle e Carnat et al., 2004; Romani et al., 2002). Studi precedenti eseguiti su varietà a pigmentazione verde avevano constatato come la clorofilla, la quercetina e la quercetina-3-O-glucoside inibissero le isoforme 1 e 2 della cicloossigenasi (Reddy et al., 2005; Vanisree et al., 2008). Il lavoro di Mugabal et al. (2010) è stato il primo ad aver riscontrato la capacità inibitoria dell'acido cicorico sull'enzima lipoperossidasi e sugli isoenzimi cicloossigenasi 1 e 2. Il lavoro metteva in luce inoltre come l'attività biologica rilevata negli estratti metanolic di *L. sativa* fosse motivata soprattutto dalla presenza di composti fenolici. Lo studio richiamava l'attenzione anche sul fatto che la differenza nell'attività biologica constatata nelle varietà verde e rossa fosse dovuta alla variazione nella composizione fenolica. Il maggiore quantitativo di queste sostanze, compresa l'esclusiva presenza delle antocianine potrebbe far risultare il consumo di lattuga a foglia rossa più benefico. Zdravkovic et al. (2014) in un lavoro svolto su tre varietà di lattuga (Vera, Neva e Emerald) invernali e a foglia verde hanno analizzato il contenuto in fenoli, flavonoidi e altri composti sottoponendole tutte a due modalità di crescita in ambiente protetto: in una serra con copertura in plastica e in una con pareti di vetro. In accordo con altri Autori (Hohl et al., 2001) i risultati mostravano un alto contenuto di fenoli e flavonoidi totali. La presenza di queste due classi di composti era determinante per la realizzazione di un'attività antiossidante, causata specialmente dalle loro spiccate proprietà ossido-riducenti che giocano un ruolo significativo nell'assorbimento e neutralizzazione dei radicali liberi, nell'abbattimento dell'ossigeno singoletto o tripletto e nella dissoluzione dei perossidi. La capacità antiossidante degli estratti di lattuga da varietà coltivate in serra di vetro e di plastica non differivano molto le une dalle altre, aspetto che era atteso dal momento che appartenevano al medesimo tipo di lattuga, mentre la ricerca con differenti tipi di varietà di lattuga mostrava grandi divergenze nella capacità antiossidante (Llorach et al., 2008). Dal lavoro emergeva come, a parità di condizioni di crescita, per tutte le varietà oggetto di studio il contenuto di composti antiossidanti di ciascuna risultasse differente nell'una rispetto all'altra. Da ciò



scaturiva un'osservazione secondo cui il livello di queste sostanze dipenderebbe dalle caratteristiche genetiche della singola varietà. Prove sempre più numerose suggeriscono che la composizione di sostanze dotate di potere antiossidante potrebbe essere alterata sia da fattori legati al genotipo sia dalle condizioni colturali. In uno studio di Liu et al. (2007) eseguito su 25 cultivar di lattuga appartenenti a 4 tipi diversi e presentanti due pigmentazioni distinte, la cui raccolta era stata eseguita in due momenti diversi della stagione estiva (luglio e settembre), veniva esaminato il modo in cui il contenuto fenolico totale fosse influenzato da tutti questi fattori. Dallo studio emergeva come l'appartenenza a una determinata cultivar, ad un particolare tipo o l'avere una specifica pigmentazione, oltre all'essere raccolte in momenti distinti, influisse sul contenuto totale di fenoli. È stato inoltre osservato come le lattughe a foglia rossa possedessero un contenuto totale di composti fenolici 2,4 volte superiore a quello riportato per le verdi appartenenti alla stessa tipologia, laddove la situazione mutava paragonando cultivar diverse appartenenti a tipologie distinte. Il periodo di raccolta non si era dimostrato influente su questo parametro. Per quanto concerne invece la capacità antiossidante misurata come facoltà di abbattimento del radicale DPPH<sup>•</sup> sono state rilevate differenze significative tra le 4 tipologie di lattuga, con il tipo a foglia che si classificava al primo posto seguito dai tipi romano, Batavia e a cappuccio. In accordo con il contenuto di fenoli totali, l'attività antiossidante di questa specie a foglia rossa risultava significativamente più elevata rispetto a quella verde, mostrandosi 0,8 volte superiore. Il valore complessivo di attività antiossidante per le lattughe raccolte nel mese di luglio era superiore dell'11,2% rispetto a quanto riscontrato per la raccolta eseguita a settembre. Dalle analisi emergeva in modo evidente come il tipo da taglio rossa possedesse il contenuto totale di fenoli e l'attività antiossidante più elevati, seguita dalla romana. Questi risultati si mostravano in sintonia con quanto riportato da Caldwell (2003), che aveva osservato come la lattuga da taglio generalmente contenesse quantità maggiori di fenoli rispetto ai tipi romana e a cappuccio. Le antocianine risultavano essere tra le principali sostanze fenoliche presenti nei tessuti fogliari della lattuga rossa (Caldwell, 2003; Dupont et al., 2000). Il più elevato livello di composti fenolici caratterizzante la lattuga rossa potrebbe essere attribuito a una maggiore presenza di antocianine e il superiore potere antiossidante

potrebbe essere connesso alle medesime sostanze. Altri risultati di questo lavoro mostravano come le piante di *L. sativa* raccolte a luglio, le quali erano dunque cresciute a temperature maggiori e sotto una superiore intensità luminosa, presentassero una capacità antiossidante più marcata rispetto a quelle raccolte a settembre. A conclusione di questo studio molto dettagliato si metteva in primo piano come aspetti quali la cultivar, il tipo e la pigmentazione potessero modificare nella lattuga sia il livello di fenoli totali sia il potere antiossidante. Le lattughe rosse generalmente contenevano la maggiore quantità di sostanze fenoliche e avevano una più forte attività antiossidante rispetto a quelle verdi, nell'ambito della stessa tipologia e sotto le medesime condizioni di crescita. Un lavoro più recente di Pérez-López et al. (2014) aveva lo scopo di approfondire le analisi su estratti idrofilici di lattuga correlati a una differente composizione fenolica. Per discernere in modo più preciso il potere antiossidante dei fenoli, l'indagine è stata focalizzata su tre cultivar di lattuga, ognuna dotata di una pigmentazione differente: verde, verde-rossa e rossa. L'obiettivo era quello di identificare il comportamento in termini di cinetica dei composti provvisti di potere antiossidante. Tale lavoro si presentava come il primo nel suo genere e aveva il fine di correlare l'andamento cinetico degli estratti idrofilici provenienti da cultivar a diversa pigmentazione con la loro relativa composizione in antiossidanti. Dall'analisi EPR del decadimento del radicale DPPH<sup>•</sup>, come prima constatazione emergeva che la cultivar verde era caratterizzata da una costante cinetica a tasso lento e intermedio, la rossa da una rapida e una intermedia e la bicolore da tutte e tre. Tali valori della costante, caratterizzanti le cinetiche di decadimento del DPPH<sup>•</sup>, sono indicative della presenza di molecole con capacità antiossidante nell'estratto idrofilico e distinguibili, appunto, per un'azione con effetto rapido, intermedio e lento. Dai dati ottenuti dalla decolorazione del radicale cationico ABTS<sup>•+</sup> si rilevava come la capacità antiossidante degli estratti idrofilici incrementasse con l'aumento della pigmentazione rossa e nel dettaglio la crescita del potere antiossidante, a paragone della lattuga verde, era maggiore del 120% e del 400% rispettivamente nella bicolore e nella rossa. Il contenuto in fenoli totali e antocianine seguiva una medesima tendenza. L'applicazione dell'analisi EPR per indagare le cinetiche di decadimento del DPPH<sup>•</sup> (Sgherri et al., 2011) sugli estratti idrofilici permetteva la discriminazione tra composti antiossidanti ad

azione lenta, intermedia e rapida. Dai risultati ottenuti era possibile correlare le diverse velocità di decadimento con la presenza o l'assenza di alcuni composti antiossidanti. Degna di nota emergeva la correlazione tra presenza di cianidina e cianidina-3-O-glucoside e il più veloce andamento antiossidante delle cultivar rossa e bicolore rispetto alla verde, che non presentavano tali composti. Nelle lattughe rossa e bicolore, la più elevata attività antiossidante, confrontata con la verde, poteva anche essere correlata con la presenza di più consistenti quantità di fenoli. Tuttavia è da tener presente che non tutti i composti fenolici svolgono un ruolo antiossidante (Rice-Evans et al., 1996). La natura antiossidante degli acidi fenolici e dei relativi esteri è connessa al numero di idrossilazioni e metossilazioni presenti sui loro anelli aromatici. L'osservato incremento di acido clorogenico nel passaggio dalla cultivar verde alla rossa potrebbe contribuire al rafforzamento della capacità antiossidante dal momento che Zlotek et al. (2011) hanno riscontrato come il potere di abbattimento del DPPH espresso dalla lattuga sia correlato in modo positivo e significativo con il contenuto di questo acido. Nella specie in questione, i flavoni e i flavonoli più comunemente rilevati presentanti due idrossilazioni, di cui una in posizione 3' e una in posizione 4' dell'anello B sono costituiti da: quercetina, quercetina-3-O-glucuronide, rutina, luteolina e luteolina-7-O-glucoside; meno consueti sono quelli provvisti di un unico gruppo ossidrilico in posizione 4' del medesimo anello, come il campferolo e l'apigenina-7-O-glucoside. Agliconi come quercetina, luteolina e campferolo sono noti per essere antiossidanti più efficaci rispetto alle loro forme glicosilate. Sulla base dei risultati ottenuti sulle osservazioni di Zlotek et al. (2011), secondo cui l'abilità di contrastare i radicali operata dalla lattuga sarebbe correlata significativamente e positivamente con la presenza di quercetina, si potrebbe ipotizzare che questo flavonoide possa essere uno degli antiossidanti responsabili dell'attività di decadimento di livello intermedio. A questo riguardo le cultivar verde e bicolore presentavano concentrazioni simili di quercetina, mostrando livelli paragonabili di antiossidanti ad azione intermedia, laddove nella cultivar rossa in cui la quercetina raggiungeva un valore 20 volte superiore la concentrazione di questa tipologia di sostanze antiossidanti era molto più elevata. In quest'ultimo tipo di lattuga la cianidina contribuiva per la maggior quota dei fenoli totali. Essa avrebbe offerto il maggiore contributo alla capacità antiossidante

registrata per questa lattuga. Nelle lattughe rossa e bicolore la più cospicua quota di acidi fenolici e flavonoidi rintracciati era presente nella forma legata e ciò secondo Harborne (1979) sarebbe conseguenza della loro compartimentazione nei vacuoli a causa della loro potenziale tossicità. A conclusione di tutto quanto osservato si accennava alla possibilità che la quercetina costituisse la maggior parte degli antiossidanti ad azione intermedia, mentre le antocianine di quelle ad effetto rapido. Un lavoro di Crozier et al. (1997) concentrato esclusivamente sullo studio dei flavonoidi contenuti nella lattuga, sottoponeva ad analisi 5 cultivar a pigmentazione distinta. Tra i risultati emergevano due constatazioni interessanti: da un lato si riscontrava come la presenza di queste molecole - e nello specifico il contenuto del flavonolo quercetina - aumentasse passando da piante a foglia verde (Lollo Bionda) a bicolore (Marvel delle Quattro Stagioni) a rossa (Lollo Rossa). In aggiunta, lo studio metteva in evidenza come fosse rimarchevole la differenza nel contenuto di questo composto paragonando i dati forniti dall'analisi delle foglie più interne a quelli delle più esterne, con queste ultime che presentavano un livello altamente superiore alle altre. In un lavoro di Gazula et al. (2007) l'obiettivo della ricerca era l'indagare sulla maniera in cui il livello di antocianine prodotte in nove cultivar di lattuga fosse influenzato dall'epoca del trapianto (inizio e fine estate) in due annate differenti (2002 e 2003). I risultati mostravano come la sintesi di queste molecole fosse superiore nei campioni cresciuti dopo trapianto più tardivo e nella prima annata e come la cultivar avesse un ruolo in questo fenomeno. In linea con quanto osservato da Gazula et al. (2005) e Kleinhenz et al. (2003), dai dati raccolti emergeva come la sintesi di antocianine fosse guidata da fattori genetici e ambientali come la temperatura e l'intensità luminosa. In questo studio, infatti, il valore maggiore tra i dati raccolti era stato determinato dalle seguenti condizioni: la temperatura media era stata tendenzialmente più elevata nell'anno 2002 e soprattutto all'epoca del trapianto tardivo. In conclusione veniva messo in primo piano come la luce fosse essenziale per la sintesi di antocianine (Reay, 1999; Weiss e Holevy, 1991) e come le lattughe cresciute con ombreggiamento presentassero un contenuto inferiore di questi composti (Kleinhenz et al., 2003). Tuttavia, temperature da moderate a basse sono ritenute innescare la biosintesi di antocianine in modo distinto e specifico e non fornire solamente un contributo

dopo l'espressione genica (Shvarts et al., 1997). Di conseguenza, in condizioni normali di crescita, la temperatura e non l'illuminazione, potrebbe esercitare la più consistente influenza sulla concentrazione di queste sostanze nella lattuga, una constatazione che è supportata da dati ottenuti in un lavoro su foglie di *Chrysobalanum icaco* (Levi-Nissim et al., 2003) e i dati ottenuti da questo studio. L'effetto inibitorio che la bassa intensità luminosa potrebbe aver esercitato sui campioni trapiantati tardivamente, potrebbe essere stato compensato dall'effetto stimolante delle basse temperature sui medesimi. I dati ottenuti, paragonando tra loro le differenti cultivar, mostravano come quelle geneticamente predisposte a contenere una maggiore quota di antocianine rispondessero in modo più netto ai parametri termici stagionali o annuali.

## CAPITOLO 5

### Scopo dello studio

L'obiettivo del presente studio è di indagare come due cultivar di lattuga, specie vegetale coltivata in tutto il mondo, per tutto l'anno e utilizzata su larga scala dai consumatori, possano rispondere a differenti condizioni di crescita dal punto di vista della sintesi dei composti fenolici. Il presente lavoro prende in considerazione due cultivar di *Lactuca sativa* L. a diversa pigmentazione della foglia, dunque con un diverso contenuto di composti fenolici, cresciute entrambe in differenti condizioni di coltura. Le due cultivar sono state poste, rispetto ai parametri di controllo, nella condizione di doversi confrontare con situazioni implicanti fattori ambientali di varia natura e combinazioni degli stessi. In un caso la crescita è avvenuta in un'atmosfera arricchita di anidride carbonica, in un'altra circostanza sotto alta intensità luminosa e in un'ultima prova la crescita si è svolta in presenza di una progressivamente sempre più elevata concentrazione di cloruro di sodio, addizionata alla soluzione nutritiva somministrata con l'acqua di irrigazione. Le prove con la concomitanza di due fattori ambientali modificati abbinati insieme prevedevano, in ogni caso, l'atmosfera arricchita di anidride carbonica ( $\text{CO}_2$  + cloruro di sodio e  $\text{CO}_2$  + elevata intensità di luce). Lo scopo del lavoro è stato quello di individuare quale delle due cultivar fosse più rispondente alle elencate situazioni di pressione ambientale e al contempo anche quello di comprendere quale condizione artificiale tra quelle proposte fosse la più favorevole per l'aumento dell'accumulo di metaboliti secondari. Il lavoro parte dal presupposto, già confermato da studi precedenti, che il metabolismo secondario delle piante e in particolare quello legato alla sintesi di fenoli, sia stimolato in gran parte anche dalla presenza di fattori abiotici manifestantisi a un livello distante dalla norma, sia in eccesso che in difetto. L'individuazione delle cultivar che possano rispondere meglio a tali situazioni e che possano quindi permettere il mantenimento di un adeguato livello di composti fenolici a funzione protettiva, non può che avere risvolti positivi sugli aspetti nutraceutici legati al consumo di prodotti per uso alimentare.

## CAPITOLO 6

### Materiali e metodi

Il presente lavoro è stato realizzato tramite una collaborazione tra il Departamento de Biología Vegetal y Ecología della Facultad de Ciencia y Tecnología, presso l'Universidad del País Vasco di Bilbao, Spagna e il Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agroambientali dell'Università di Pisa (DiSAAA-a). Il materiale vegetale oggetto di analisi è pervenuto al DiSAAA-a sotto forma di polvere già sottoposta ai processi di essiccazione e liofilizzazione.

Le fasi precedenti, vale a dire la semina, la coltivazione e la raccolta sono state tutte interamente condotte all'interno del Dipartimento di Bilbao. Presso tale sede sono stati utilizzati semi di due cultivar di lattuga (*Lactuca sativa* L.) disponibili sul mercato (fig. 5 a, b): una a foglia verde, Bionda di Parigi Batavia (PB) e un'altra a foglia rossa, Foglia di Quercia (Clemente Viven, Victoria-Gasteiz, Spagna).

Figura 5 - Cultivar di *L. sativa* adoperate nel presente lavoro.



a - cv Bionda di Parigi



b - cv Foglia di Quercia

La semina è stata eseguita in contenitori di materiale plastico di 10 cm di larghezza e 15 cm di altezza, riempiti con una mistura di perlite e vermiculite nel rapporto 3:1 (v/v). Sette giorni dopo la semina (D.A.S. = days after sowing), le piantine di lattuga sono state diradate lasciando una singola pianta

per vaso. La coltivazione ha avuto luogo in camere di crescita ad ambiente controllato, a 25/18°C (giorno/notte) e con un livello di umidità relativa del 60/80% (giorno/notte). Durante il periodo della crescita le piantine sono state irrigate con una soluzione di Hoagland (Hoagland e Arnon, 1938) ogni due giorni. Questo lavoro ha previsto l'allestimento di sei differenti condizioni colturali, ottenute agendo sulla concentrazione di CO<sub>2</sub>, sull'aggiunta di cloruro di sodio alla soluzione nutritiva e sull'intensità luminosa.

Prima di descrivere le sei diverse prove colturali è opportuno definire le condizioni della prova di controllo contrapposte a quelle che possono essere definite invece le condizioni modificate. La concentrazione di biossido di carbonio presa come valore di controllo era quella presente a livello ambientale, ossia pari a 400 ppm, mentre quella adoperata per l'ambiente arricchito era innalzata a 700 ppm, il primo valore era mantenuto per tutta la durata dell'esperimento (da 7 a 39 DAS), mentre il valore maggiore aveva agito per 4 giorni (da 35 a 39 DAS). La radiazione fotosinteticamente attiva (PAR) di base era impostata su 400  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ , mentre la concentrazione di NaCl era pari a zero. Per ognuna delle due atmosfere utilizzate nelle camere di crescita sono state predisposte tre tipologie di trattamento. Un primo set prevedeva la crescita delle due cultivar di lattuga nelle due diverse atmosfere. Questi primi due schemi sperimentali costituivano il controllo (C) e la crescita in atmosfera arricchita artificialmente di anidride carbonica (CO<sub>2</sub>). Un secondo set prevedeva la crescita di entrambe le cultivar nelle due diverse concentrazioni del gas con l'aggiunta in una di esse di un supplemento di cloruro di sodio alla soluzione di Hoagland fino al raggiungimento di una concentrazione di 200 mM dal 35° DAS al 39° DAS, dunque nell'arco di 4 giorni e dopo 2 somministrazioni complessive. Questi ulteriori due set rappresentavano la prova di crescita in presenza di elevata salinità (S) e della medesima situazione in presenza di 700 ppm di CO<sub>2</sub> (S+CO<sub>2</sub>). Il terzo ed ultimo allestimento sperimentale consisteva nella crescita di entrambe le cultivar nelle due diverse concentrazioni del gas con un livello di PAR di 400 e 700  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  (analogamente per un arco di tempo di 28 giorni), realizzando così, rispettivamente, la prova di crescita sotto elevata PAR (L) e la prova di coltura in presenza anche di un'elevata concentrazione di anidride carbonica (L+CO<sub>2</sub>).



Da questo momento nel testo si farà ricorso alle seguenti sigle per indicare i vari set sperimentali:

C: controllo;

S: NaCl 200 mM;

L: PAR 700  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ ;

CO<sub>2</sub>: 700 ppm CO<sub>2</sub>;

S+CO<sub>2</sub>: NaCl 200 mM + 700 ppm CO<sub>2</sub>;

L+CO<sub>2</sub>: PAR 700  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  + 700 ppm CO<sub>2</sub>.

Tutte e sei le condizioni sperimentali sono state realizzate per la cultivar a foglia verde e per quella a foglia rossa.

#### 6.1 - Estrazione dei campioni per le analisi

I composti fenolici sono stati estratti dal materiale liofilizzato giunto presso il laboratorio della sezione di Chimica Agraria del DiSAAA-a per mezzo di una soluzione opportunamente preparata.

La soluzione utilizzata è stata ottenuta miscelando metanolo anidro (70% in volume) e acido cloridrico 4 N al 37% (0,1% in volume). Il resto era composto da acqua distillata grado milli-Q. La miscela è stata sottoposta a degassamento con elio per un tempo di 20 min per renderla quanto più possibile priva di ossigeno disciolto.

L'estrazione dei vari campioni liofilizzati, ognuno con un peso secco compreso tra 0,1 e 0,2 g, è stata effettuata in mortaio servendosi, per ogni campione, di 7 ml di soluzione. Gli estratti sono stati sottoposti a sonicazione per 30 min. Successivamente, sono stati centrifugati per 10 min a 11.000 rpm a 4°C. Da ogni campione è stata recuperata la fase superiore che ha subito degassamento con elio per allontanare l'ossigeno e filtrazione con filtri Sartorius (Goettingen,

Germania) (Ministart 0,45  $\mu\text{m}$ ) per rimuovere ogni materiale sospeso. I campioni così trattati sono stati preparati per la successiva determinazione della specifica composizione in acidi fenolici liberi e coniugati, in flavonoidi ed antocianine previa diluizione fatta in base a precedenti prove.

## 6.2 - Analisi dei flavonoidi

Le analisi quantitative e qualitative sul contenuto in flavonoidi sono state condotte tramite RP-HPLC. L'operazione prevedeva l'iniezione di 20  $\mu\text{l}$  di campione in un sistema Waters 515 fornito di colonna 4,6 mm  $\times$  250 mm (Prodigy ODS column, Phenomenex, Bologna). La determinazione è stata condotta alla lunghezza d'onda di 360 nm utilizzando un detector Waters 2487 dual UV-visibile. L'analisi è stata condotta per la durata di 35 min alla temperatura controllata e costante di 25°C. La fase mobile A conteneva acqua acidificata con acido formico fino a pH 2,7, mentre la fase mobile B consisteva in metanolo. Un gradiente lineare dal 10 al 90% di fase mobile B è stato fatto scorrere alla velocità di 1 ml/min. La quantificazione è stata effettuata con una miscela standard da 20 ng contenente i seguenti composti: luteolina-7-O-glucoside, rutina, quercetina-3-O-glucoside, miricetina, quercitrina, quercetina-3-O-glucuronide, quercetina, luteolina e campferolo. L'analisi del cromatogramma è stata compiuta con l'utilizzo del programma Millennium 32 (Waters). Per l'analisi di questa classe di composti, dopo alcune prove, si è scelta una diluizione dei campioni nella proporzione di 1:20, ottenuta miscelando 20  $\mu\text{l}$  di estratto in 380  $\mu\text{l}$  di metanolo al 100%.

## 6.3 - Analisi delle antocianine

Le analisi per la determinazione quantitativa e qualitativa di questa classe di composti sono state condotte con lo stesso protocollo adottato per la precedente classe di fenoli, con la sola differenza che la lettura è stata compiuta a 520 nm. La quantificazione dei composti è stata ottenuta con una miscela standard da 200 ng composta da cianidina e cianidina-3-O-glucoside. Per l'analisi di tali

sostanze si è scelta una diluizione con rapporto di 1:10 dei campioni, realizzata miscelando 100 µl di estratto con 900 µl di soluzione contenente il 70% di metanolo e lo 0,1% di acido cloridrico 4 N al 37%.

#### 6.4 - Analisi degli acidi fenolici liberi

Per la determinazione quantitativa e qualitativa di questi composti fenolici si è seguita la procedura riportata per i precedenti metaboliti. Le uniche differenze introdotte sono state le fasi mobili, la lunghezza d'onda alla quale è avvenuta la lettura e la durata del processo analitico.

Per quanto concerne il primo punto, la fase mobile A consisteva in 10 ml di acido acetico al 2% in 490 ml di acqua milli-Q; la fase mobile B, invece, era composta da 5 ml di acido acetico al 2%, 75 ml di acetonitrile al 30% in 170 ml di acqua milli-Q. La lettura è stata condotta alla lunghezza d'onda di 280 nm per 60 min. La quantificazione dei singoli composti è stata ottenuta con una curva standard e servendosi di una miscela standard da 200 ng dei seguenti composti: acido gallico, protocatecuico, *p*-idrossibenzoico, clorogenico, vanillico, caffeico, siringico, cumarico, ferulico e cichorico. Per l'esecuzione della lettura dei campioni si è scelta una diluizione nel rapporto 1:10, ottenuta miscelando 30 µl di estratto in 270 µl di soluzione contenente il 70% di metanolo e lo 0,1% di acido cloridrico 4 N al 37%.

#### 6.5 - Analisi degli acidi fenolici coniugati

La determinazione degli acidi fenolici coniugati è stata svolta dopo idrolisi basica eseguita con una soluzione di NaOH 4 N degassata con azoto per un tempo di 10 min. Per ogni 10 ml di NaOH sono stati sciolti 0,1 g di acido ascorbico e 0,037 g di Na<sub>2</sub>EDTA. La soluzione è stata aggiunta a ciascun campione nel rapporto 1:1 (v/v) addizionandone 400 µl a 400 µl di estratto. Dopo 60 min di incubazione in assenza di luce, il pH dei campioni è stato acidificato fino al valore di 2 con l'aggiunta di 150 µl di HCl 12 N al 37%. Le miscele sono state estratte tre volte consecutive con 1 ml di etilacetato (grado HPLC). La fase superiore recuperata dopo centrifugazione a 6.000 rpm per 10 min è stata portata a secco mediante rotavapor. Prima della lettura, ogni campione è stato recuperato con 500 µl di soluzione costituente la fase mobile

B utilizzata per l'analisi all'HPLC. L'estratto recuperato è stato sottoposto a purificazione attraverso un filtro Sartorius (Gottingen, Germania) (Ministart 0,45 µm) per la rimozione di qualunque materiale sospeso.

#### 6.6 - Analisi dell'attività antiossidante totale

Il radicale cationico dell'acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico), (ABTS<sup>\*+</sup>) è stato generato miscelando 19,18 g di ABTS disciolti in 5 ml di acqua con 3,33 mg di K<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> sciolto a sua volta in 88 µl di acqua. Il cambiamento di colore della soluzione così composta indicava il raggiungimento dello scopo. La soluzione è utilizzata dopo 24 h di incubazione in assenza di luce. Una quota di 500 µl di questa soluzione è stata disciolta in 44 ml di acqua milli-Q. I campioni sottoposti a lettura spettrofotometrica sono stati diluiti con un rapporto di 1:10 sciogliendo 10 µl di estratto in 90 µl di acqua. È stato predisposto un bianco per la lettura composto da 1 ml di soluzione e 30 µl di acqua, mentre i campioni sono stati preparati aggiungendo 1 ml di soluzione a 30 µl di estratto. La lettura è compiuta alla lunghezza d'onda di 734 nm per 5 min con uno spettrofotometro Varian Cary 1 e il programma di acquisizione/elaborazione CaryWin. Successivamente all'aggiunta dell'estratto, il calo nell'assorbanza è stato comparato con quello dello standard Trolox (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcromico-2-carbossilico), un analogo idrosolubile della vitamina E. La capacità antiossidante è stata espressa in termini di Trolox equivalente (TEAC) per grammo di peso secco del materiale vegetale.

#### 6.7 - Fenoli totali

La determinazione dei composti fenolici totali (acidi fenolici, flavonoidi, antocianine) è stata condotta seguendo il metodo riportato da Nguyen e Niemeyer (2008) basato sulla reazione tra questi composti e il reagente di Folin-Ciocalteu, consistente in una miscela di fosfomolibdato e fosfotungstato. I campioni prima della lettura spettrofotometrica sono stati diluiti nel rapporto di 1:6, tramite miscelazione di 50 µl di estratto con 250 µl di acqua. Di ogni campione si è prelevata un'aliquota di 50 µl cui sono stati addizionati 450 µl di acqua. Sono stati poi aggiunti 250 µl di reattivo di Folin-Ciocalteu e si è lasciato incubare per 10 min, tempo necessario a far avvenire la reazione.

Ciascun campione è stato poi addizionato di 1,25 ml di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20%. Dopo 20 min di ulteriore incubazione, i campioni sono stati sottoposti a lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 735 nm. Per il calcolo si è utilizzata una curva di taratura predisposta usando l'acido gallico come standard. La concentrazione di fenoli totali è stata espressa in termini di mg di acido gallico equivalente (GAE) per grammo di peso secco del materiale vegetale.

## CAPITOLO 7

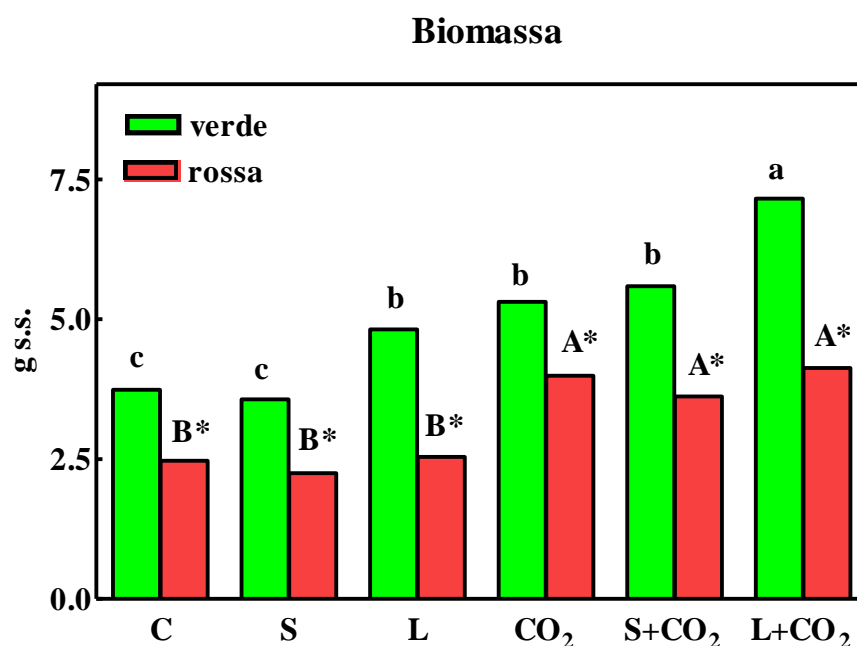
### Risultati

#### 7.1 - Crescita

Dall'osservazione dei dati relativi al grado di sviluppo ottenuto dalle due lattughe quando poste nelle differenti condizioni colturali è in primo luogo necessario mettere in evidenza il fatto che la cultivar Bionda di Parigi e la Foglia di Quercia Rossa, nelle rispettive prove di controllo, avevano raggiunto l'una un livello di sviluppo statisticamente differente dall'altra, avendo la prima riportato 3,74 g di biomassa dopo raccolta ed essiccazione, mentre l'altra aveva registrato 2,47 g. Concentrando adesso l'analisi esclusivamente sugli effetti che i vari trattamenti avevano espletato sulla cultivar a foglia verde (fig. 6) si poteva constatare come la crescita sotto la pressione esercitata dalla concentrazione di NaCl 200 mM non avesse esercitato apprezzabili effetti, avendo fatto riportare alla lattuga un valore analogo alla prova C e pari a 3,57 g. L'esposizione ad una maggiore intensità luminosa in fase di crescita compiva, invece, un effetto significativamente stimolante facendo raggiungere uno sviluppo pari a 4,82 g. La crescita in un ambiente arricchito di CO<sub>2</sub> determinava un effetto dal significato statistico comparabile a quanto registrato da L, con 5,31 g di biomassa secca. La presenza della concentrazione di sale che aveva dimostrato di non essere influente di per sé sulla crescita, quando abbinata all'atmosfera arricchita di CO<sub>2</sub> determinava un effetto di tipo additivo in linea con le prove L e CO<sub>2</sub> dal punto di vista della statistica, con 5,59 g registrati. Infine l'effetto stimolante fornito dalla maggiore intensità luminosa combinato con l'analogamente favorevole azione della concentrazione superiore di CO<sub>2</sub> risultava in una sinergia che determinava una crescita marcatamente più elevata, con questa cultivar che raggiungeva i 7,16 g.

Per quanto attiene l'andamento della crescita della cultivar a foglia rossa (fig. 6) essa, sia nel trattamento S che in L non dimostrava di aver usufruito di un effetto stimolante sulla propria crescita, avendo riportato infatti valori, rispettivamente di 2,25 g e 2,54 g di peso secco, entrambi statisticamente identici alla prova C. La situazione mutava invece dopo la crescita in atmosfera ricca di CO<sub>2</sub>: in questo trattamento si registrava per la prima volta un incremento significativo fino a 3,99 g. Sulla stessa lunghezza d'onda di questa prova, a livello di significato statistico, si collocavano i dati registrati dai i trattamenti combinati S+CO<sub>2</sub> e L+CO<sub>2</sub>, rispettivamente riportanti 3,62 g e 4,13 g.

Figura 6 - Valori relativi allo sviluppo (g di biomassa secca) di piante di lattuga verde e rossa cresciuta in differenti condizioni ambientali.



## 7.2 - Acidi fenolici liberi e coniugati totali

Per quanto riguarda il contenuto di acidi fenolici totali, nella cultivar verde (fig. 7) non si osservava un incremento significativo tra le tesi C e S (8,70 e 8,99 mg/g s.s., rispettivamente). Un aumento più consistente si riscontrava per il

trattamento L che raggiungeva 12,69 mg/g s.s. Una lieve flessione, ma statisticamente significativa, si riportava per la tesi CO<sub>2</sub> (11,89 mg/g s.s.). Quando, infine, la cultivar era stata sottoposta ai trattamenti S+CO<sub>2</sub> e L+CO<sub>2</sub>, si rilevavano valori complessivi leggermente inferiori ai due precedenti, ma tra loro statisticamente identici (9,83 e 9,99 mg/g s.s., rispettivamente).

Per quanto concerne la cultivar a foglia rossa (fig. 7), è opportuno rilevare come questa, rispetto alla verde, abbia mostrato un contenuto di acidi fenolici totali nettamente superiore. Questo dato è osservabile dal confronto diretto tra i valori registrati dai due campioni di controllo delle due cultivar: se da un lato quella a foglia verde presentava un livello di acidi fenolici di 8,70 mg/g s.s., la rossa raggiungeva 22,48 mg/g s.s., ossia un livello 2,58 volte maggiore. All'interno delle varie tesi approntate per la lattuga rossa, i risultati hanno mostrato un andamento più vario. Si è osservato un incremento statisticamente significativo nel passaggio dalla tesi C alla S (25,04 mg/g s.s.) e da quest'ultimo alla L (26,77 mg/g s.s.), fino al raggiungimento del valore più alto in CO<sub>2</sub>, pari a 32,90 mg/g s.s. Le tesi S+CO<sub>2</sub> e L+CO<sub>2</sub> mostravano valori complessivi minori: nel primo caso si raggiungevano i 23,58 mg/g s.s., valore di 1,10 mg superiore alla tesi C, mentre nel secondo caso gli acidi fenolici totali si attestavano sui 26,53 mg/g s.s., valore analogo alla tesi L.

Dopo il trattamento idrolitico alcalino dei campioni, il contenuto di acidi fenolici totali ha mostrato un andamento diverso nelle varie tesi. È opportuno sottolineare che l'idrolisi in ambiente basico di questa classe di composti per la maggior parte è il risultato della liberazione di acido caffeico dai suoi precursori, gli acidi clorogenico e cichorico. Partendo da questa constatazione, il contenuto totale di acidi fenolici a seguito del processo d'idrolisi era necessariamente in funzione del livello dei due suddetti acidi nei campioni. Nell'ambito della cultivar verde (fig. 8) si notava un contenuto analogo tra le prove C ed S (10,70 e 10,18 mg/g s.s., rispettivamente), in linea con quanto mostrato dai medesimi trattamenti prima della procedura. Un significativo aumento è stato riscontrato dal campione L (15,20 mg/g s.s.), mentre tra il suo valore e quelli di C ed S si poneva la prova CO<sub>2</sub>, con 12,38 mg/g s.s. Il valore massimo è stato registrato dal set S+CO<sub>2</sub> con 16,38 mg/g s.s. Infine, il campione L+CO<sub>2</sub> si attestava su un valore appena inferiore di 11,38 mg/g s.s.



Lo stesso ragionamento seguito precedentemente può essere applicato per le tesi appartenenti alla cultivar rossa (fig. 8). Infatti, in seguito alla procedura idrolitica il campione C mostrava un livello maggiore di acidi fenolici paragonato alla prova S (rispettivamente 27,72 e 24,04 mg/g s.s.). Il campione della prova L mostrava un contenuto superiore ai precedenti e pari a 32,62 mg/g s.s., del tutto analogo ai 32,17 mg/g s.s. riportati dall'analisi della prova L+CO<sub>2</sub>. Un contenuto superiore ai trattamenti C ed S e inferiore a L era mostrato dalle prove CO<sub>2</sub> ed S+CO<sub>2</sub>, con valori rispettivamente di 29,24 e 27,97 mg/g s.s.

Figura 7 - Contenuto di acidi fenolici liberi totali (mg/g s.s.) in foglie di lattuga verde e rossa cresciuta in differenti condizioni ambientali.

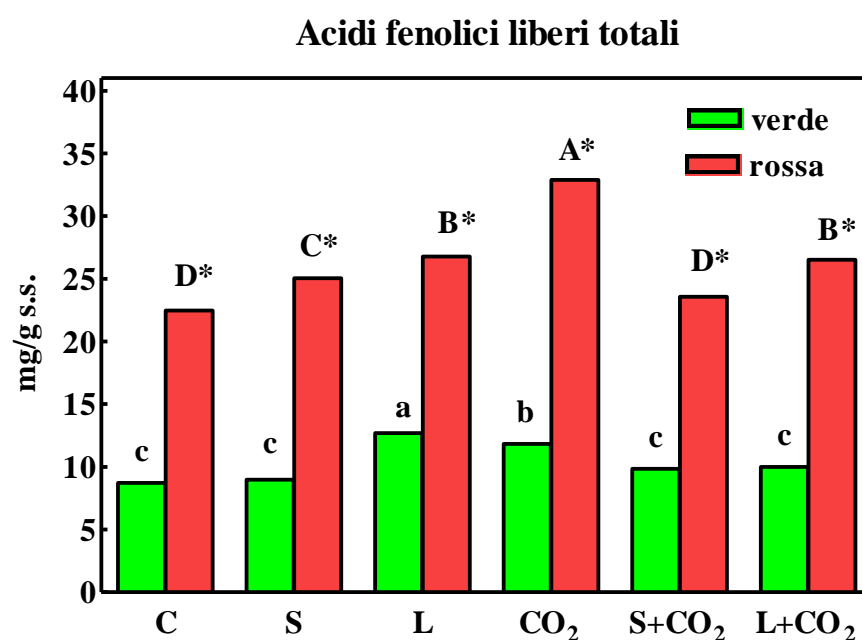
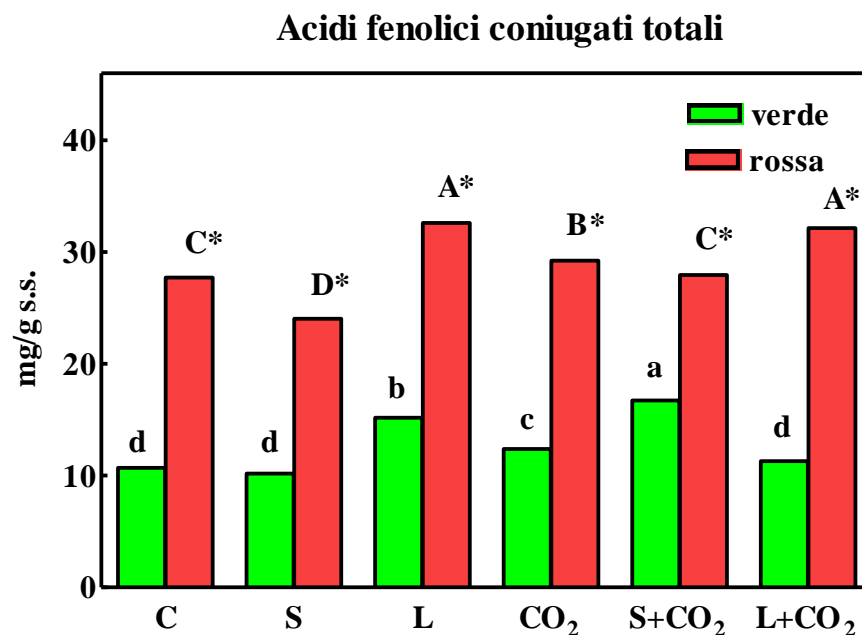


Figura 8 - Contenuto di acidi fenolici coniugati totali (mg/g s.s.) in foglie di lattuga verde e rossa cresciuta in differenti condizioni ambientali.



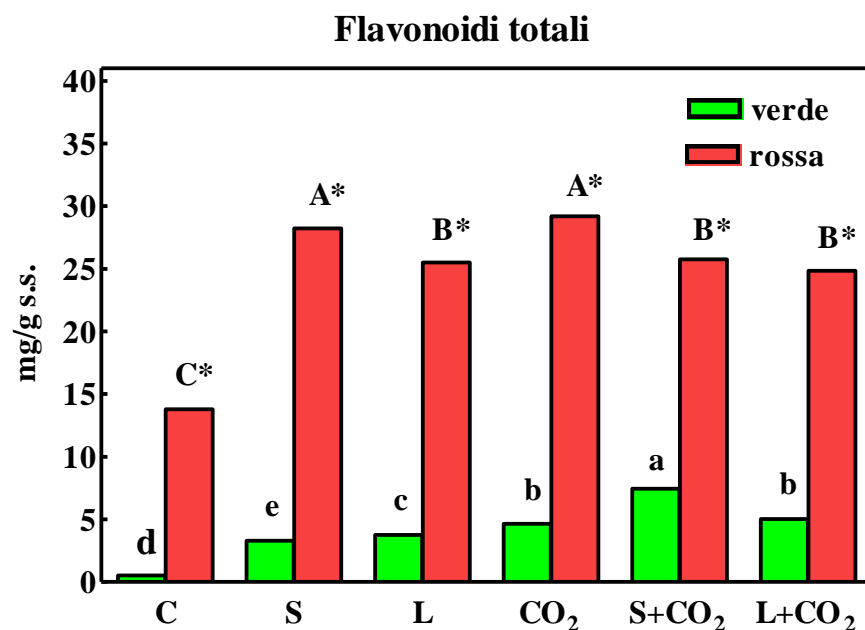
### 7.3 - Flavonoidi totali

Per quanto riguarda la cultivar verde (fig. 9), si osservava un incremento rimarchevole, superiore alle sei volte, nel passaggio dalla tesi C alla S: dagli 0,51 mg/g s.s. della prima, la biosintesi raggiungeva un totale di 3,30 mg/g s.s. nella seconda. Il trattamento L si manteneva sullo stesso ordine di grandezza, con 3,75 mg/g s.s.. Un significativo incremento era evidenziato dalla tesi CO<sub>2</sub> con 4,65 mg/g s.s. L'effetto sinergico dell'alta salinità e della concentrazione elevata di anidride carbonica determinava nella prova S+CO<sub>2</sub> il livello più alto di questi composti, pari a 7,45 mg/g s.s. Il trattamento L+CO<sub>2</sub> mostrava un valore intermedio tra il precedente e quello osservato nella tesi CO<sub>2</sub> (5,03 mg/g s.s.).

La cultivar a pigmentazione rossa (fig. 9), rispetto alla precedente, presentava un contenuto iniziale di flavonoidi notevolmente superiore: se da una parte la lattuga a foglia verde conteneva appena 0,51 mg/g s.s., quella rossa, nella tesi C, palesava un livello pari a 13,79 mg/g s.s., dunque circa 26 volte superiore. All'interno delle varie tesi sperimentali è interessante notare come la

coltivazione su terreno salino (S) avesse più che raddoppiato il contenuto di questi metaboliti che, infatti, dai 13,79 mg/g s.s. di C passavano a 28,23 mg/g s.s. Un decremento significativo (25,49 mg/g s.s.) era osservato nella prova L. Il livello massimo di flavonoidi, pari a 29,20 mg/g s.s., è stato registrato per il trattamento CO<sub>2</sub>. Infine, per le tesi S+CO<sub>2</sub> e L+CO<sub>2</sub> risultavano due valori non distanti tra loro, ma diversi statisticamente, rispettivamente pari a 25,77 e 24,83 mg/g s.s.

Figura 9 - Contenuto di flavonoidi totali (mg/g s.s.) in foglie di lattuga verde e rossa cresciuta in differenti condizioni ambientali.

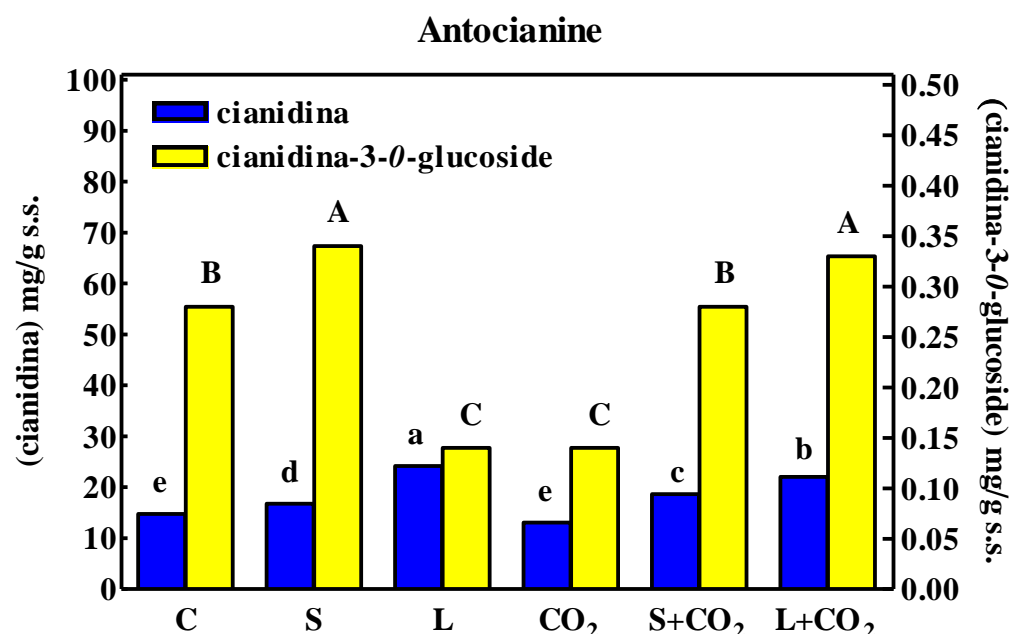


#### 7.4 - Antocianine

Lo studio di questa classe di composti fenolici è stato eseguito esclusivamente sulla cultivar a foglia rossa dal momento che studi condotti in precedenza non avevano evidenziato la loro presenza nella cultivar a foglia verde. Dai risultati (fig. 10) è emerso come le antocianine totali siano rappresentate per il 98,0-99,4% da cianidina. Prendendo in esame il contenuto totale, si può osservare come da un livello iniziale della tesi C di 15,06 mg/g s.s. si sia registrato un

aumento moderato, tuttavia significativo statisticamente, passando alla prova S (17,09 mg/g s.s.). Certamente più rimarchevole si era dimostrato l'effetto della maggiore intensità luminosa (L) sulla sintesi di antocianine: si raggiungevano, infatti, i 24,28 mg/g s.s., valore più alto riportato tra tutti i trattamenti, seguito solo, con circa 2 mg di differenza, dalla prova L+CO<sub>2</sub>, che a sua volta registrava un valore di 22,36 mg/g s.s.. Il biossido di carbonio in concentrazione superiore alla norma aveva compiuto un effetto inibente sulla sintesi di antocianine, dal momento che si registravano nel complesso 13,25 mg/g s.s., quantità di 1,81 mg inferiore alla tesi di controllo. Infine, la prova S+CO<sub>2</sub> mostrava un livello di 18,94 mg/g s.s., valore che si attestava tra i risultati delle tesi S e L+CO<sub>2</sub>.

Figura 10 - Contenuto di antocianine (mg/g s.s.) in foglie di lattuga rossa cresciuta in differenti condizioni ambientali.



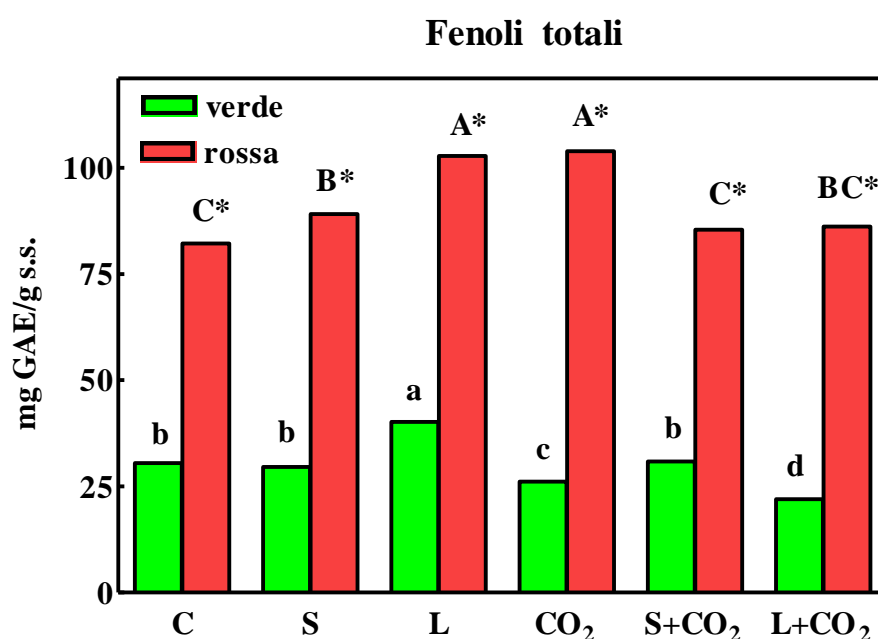
#### 7.5 - Fenoli totali

Per quanto riguarda la lattuga a foglia verde (fig. 11), il valore più alto è stato registrato per la tesi L, con 40,20 mg/g s.s. A seguire si erano attestate le tesi S+CO<sub>2</sub> e C, rispettivamente con 30,86 e 30,49 mg/g s.s. Statisticamente

analogo era il livello di 29,58 mg/g s.s. riportato dalla tesi S. Infine, le prove CO<sub>2</sub> e L+CO<sub>2</sub> raggiungevano, nell'ordine, valori di 26,13 e 22,02 mg/g s.s.

Le diverse tesi predisposte per la lattuga rossa (fig. 11), diversamente dalla precedente, mostravano un andamento diverso. È opportuno rilevare come si fosse potuta constatare una cospicua differenza iniziale tra le due cultivar, rispettivamente pari a 30,49 e 82,19 mg/g s.s. per la verde e la rossa. Questo valore più elevato è motivato dai livelli superiori di acidi fenolici e flavonoidi presenti nella lattuga a foglia rossa e dalla presenza riscontrata in questa, ma non nell'altra, della classe delle antocianine. Subito dopo la tesi C, in ordine crescente, si collocavano i trattamenti S+CO<sub>2</sub> e L+CO<sub>2</sub>, con valori di 85,4 e 86,2 mg/g s.s.. A un livello superiore si attestava la prova S, con 89,10 mg/g s.s. Netamente superiori alla tesi controllo e simili dal punto di vista statistico, si mostravano le prove L e CO<sub>2</sub>, l'una con 102,80 mg/g s.s. e l'altra con 103,91 mg/g s.s.

Figura 11 - Contenuto di fenoli totali (mg GAE/g s.s.) in foglie di lattuga verde e rossa cresciuta in differenti condizioni ambientali.

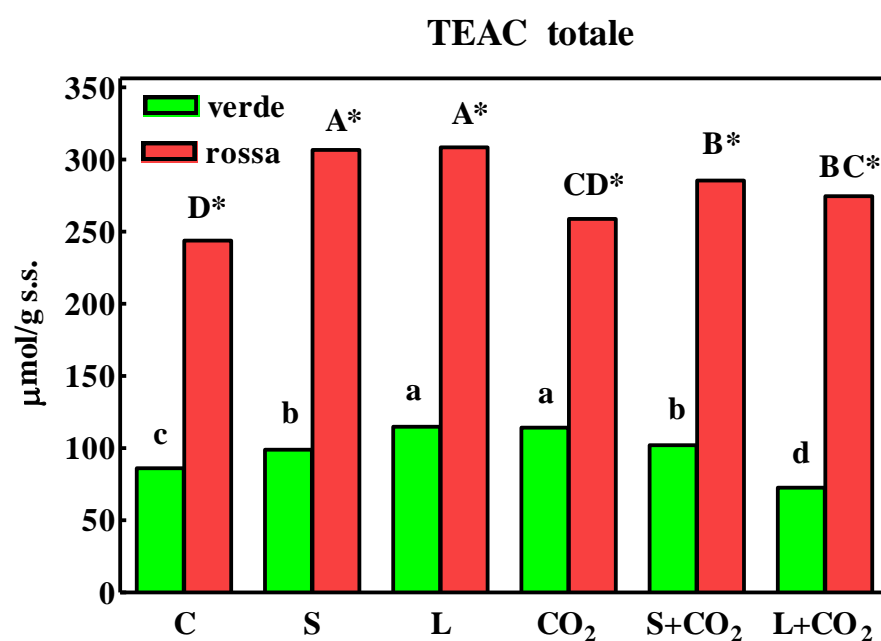


## 7.6 - TEAC totale

Nella lattuga a pigmentazione verde (fig. 12) il valore più basso era mostrato dalla tesi L+CO<sub>2</sub>, con 72,63  $\mu\text{mol/g s.s.}$ . Il controllo riportava un valore di 86,09  $\mu\text{mol/g s.s.}$  Superiori e statisticamente simili tra loro erano i risultati riscontrati nelle prove S e S+CO<sub>2</sub> rispettivamente con 98,95 e 102,02  $\mu\text{mol/g s.s.}$  Infine, i valori più alti e statisticamente identici, erano quelli riportati nelle tesi L e CO<sub>2</sub>, pari, nell'ordine, a 114,91 e 114,18  $\mu\text{mol/g s.s.}$

Per quanto riguarda la cultivar a foglia rossa (fig. 12), si può notare una tendenza tra i vari trattamenti diversa rispetto a quanto si era verificato per la cultivar verde. In questo contesto, il valore più basso era riportato dalla prova C con 243,83  $\mu\text{mol/g s.s.}$ , seguita in ordine crescente dalla tesi CO<sub>2</sub> con 258,75  $\mu\text{mol/g s.s.}$  Valori superiori sono stati ottenuti a seguito delle prove S+CO<sub>2</sub> ed L+CO<sub>2</sub> con, nell'ordine, 285,25 e 274,58  $\mu\text{mol/g s.s.}$  Al livello più alto e con quantità tra loro statisticamente affini si ponevano le tesi S e L, l'una con 306,48 e l'altra con 308,31  $\mu\text{mol/g s.s.}$

Figura 12 - Attività antiossidante totale ( $\mu\text{mol/g s.s.}$ ) in foglie di lattuga verde e rossa cresciuta in differenti condizioni ambientali.



## 7.7 - Acidi fenolici liberi

Nell'analisi degli acidi fenolici liberi, ossia prima all'esecuzione di un trattamento d'idrolisi alcalina sui campioni, sia nella cultivar verde sia nella rossa non sono stati rintracciati in quantità determinabili, in nessuno dei vari trattamenti, gli acidi p-idrossibenzoico, vanillico e siringico. Al contrario, composti riscontrati in tutte le prove per ambedue le cultivar sono stati gli acidi clorogenico, caffeico e cicorico. I restanti acidi fenolici sono stati individuati in alcune prove a concentrazioni diverse, sia nella lattuga verde (tab. 2) sia nella rossa (tab. 3), mentre in altre non è stato possibile rilevarli (acidi gallico, protocatecuico, cumarico e ferulico). La lattuga verde (fig. 13) presentava in tutti i trattamenti un contenuto tra l'83 e il 90% sul totale di acido cicorico e tra il 9 e il 15% di acido clorogenico. Tradotto in termini di mg/g s.s., si registrava un intervallo oscillante tra 7,39 mg/g s.s. (C) e 10,89 mg/g s.s. (L) per il primo e tra 0,97 mg/g s.s. (S) e 1,65 mg/g s.s. (L) per il secondo.

La lattuga a foglia rossa (fig. 13), invece, presentava una composizione interna in acidi fenolici differente. La pur sempre netta prevalenza dei suddetti acidi mostrava una distribuzione differente che si attestava su una soglia tendente al 50% della composizione totale per entrambi. Questa cultivar presentava, inoltre, valori di acido clorogenico superiori a quelli riscontrati nell'altra cultivar di circa dieci volte, variando da un minimo di 10,08 mg/g s.s. (C) a un massimo di 17,81 mg/g s.s. (CO<sub>2</sub>). L'acido cicorico, invece, palesava un comportamento analogo a quanto constatato nella cultivar verde con una variabilità compresa tra 11,30 mg/g s.s. (S+CO<sub>2</sub>) e 14,93 mg/g s.s. (CO<sub>2</sub>).

Tabella 2. Contenuto di acidi fenolici liberi minori ( $\mu\text{g/g}$  s.s.) in foglie di lattuga verde cresciuta in differenti condizioni ambientali.

	<b>C</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>S+CO<sub>2</sub></b>	<b>L+CO<sub>2</sub></b>
Acido gallico	4,0 b	5,8 a	nd	nd	nd	nd
Acido protocatecuico	18,2 a*	7,7 b*	nd	nd	nd	nd
Acido caffeico	86,6 bc	99,7 b*	149,6 a*	78,2 c	91,6 b	94,5 b
Acido cumarico	7,5 b*	8,8 ab*	6,0 b*	nd	11,2 a*	nd
Acido ferulico	nd	nd	nd	nd	nd	14,2*

nd, non determinabile.

C, controllo; S, salinità; L, luce; nd, non determinabile. In ciascuna riga lettere differenti indicano valori significativamente diversi per  $P \leq 0.05$ . Per ciascun trattamento il segno \* indica valori significativamente diversi rispetto alla varietà rossa per  $P \leq 0.05$ .



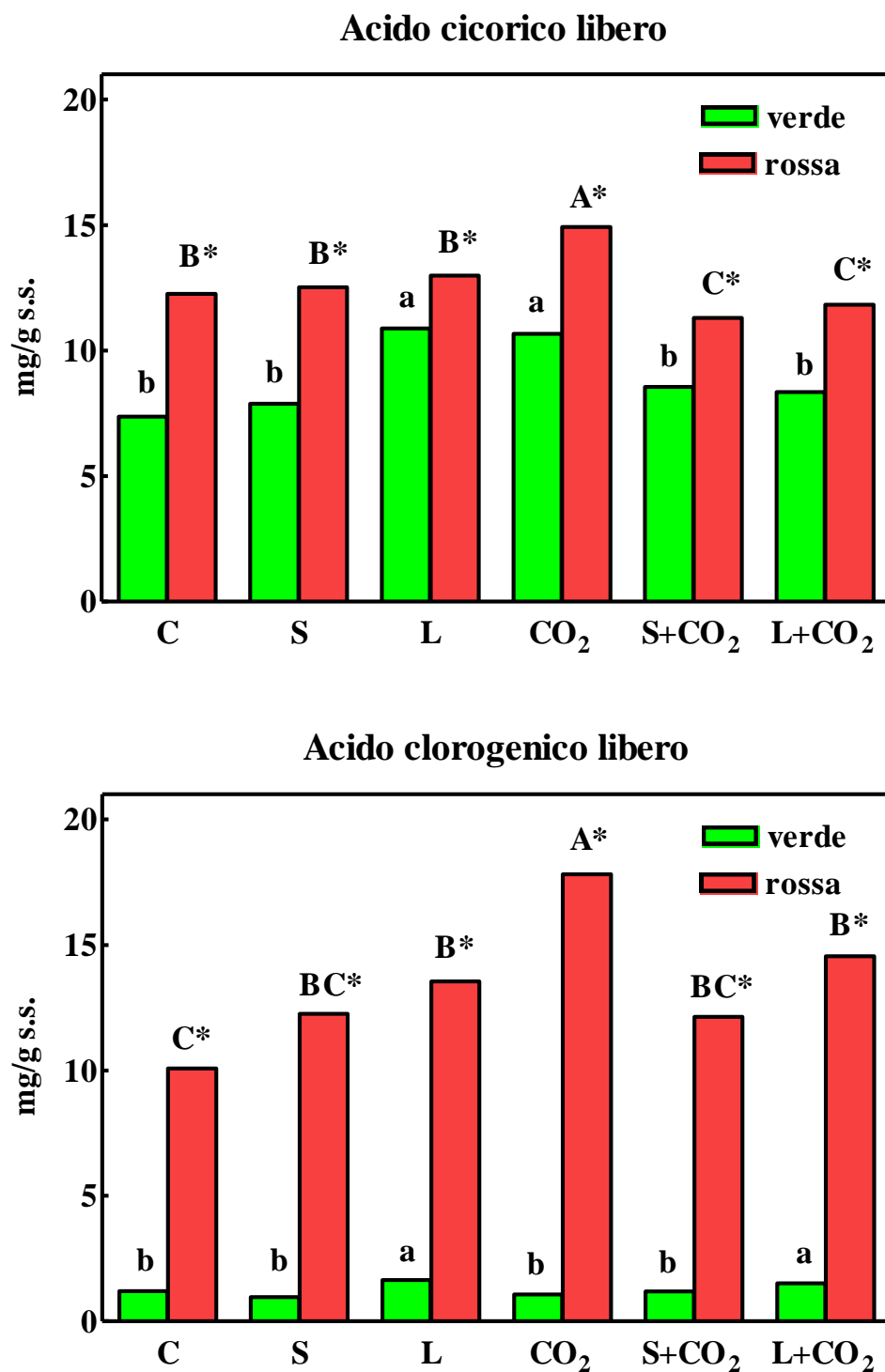
Tabella 3. Contenuto di acidi fenolici liberi minori ( $\mu\text{g/g}$  s.s.) in foglie di lattuga rossa cresciuta in differenti condizioni ambientali.

	<b>C</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>S+CO<sub>2</sub></b>	<b>L+CO<sub>2</sub></b>
Acido gallico	nd	nd	nd	nd	6,2*	nd
Acido protocatecuico	37,6 A*	12,9 B*	nd	nd	nd	nd
Acido caffeico	89,6 B	146,2 A*	9,7 C*	98,9 B	83,5 B	123,1 AB
Acido cumarico	101,1 B*	88,8 C*	198,8 A*	59,2 D*	63,5 D*	nd
Acido ferulico	nd	34,1 B*	48,4 A*	nd	nd	30,2 B*

nd, non determinabile.

C, controllo; S, salinità; L, luce; nd, non determinabile. In ciascuna riga lettere differenti indicano valori significativamente diversi per  $P \leq 0.05$ . Per ciascun trattamento il segno \* indica valori significativamente diversi rispetto alla varietà verde per  $P \leq 0.05$ .

Figura 13 - Contenuto di acido cicorico e acido clorogenico liberi (mg/g s.s.) in foglie di lattuga verde e rossa cresciuta in differenti condizioni ambientali.



## 7.8 - Acidi fenolici coniugati

Dopo trattamento idrolitico con soluzione alcalina è stato possibile esaminare i valori degli acidi fenolici coniugati presenti nelle due cultivar di lattuga. L'effetto più evidente e ovviamente prevedibile dell'idrolisi basica è stato la comparsa di acido caffeico, presente a livello di tracce nei campioni prima del trattamento (0,09-0,15 mg/g s.s., i valori minimi e massimi in entrambe le lattughe), considerando la cospicua presenza degli acidi clorogenico e cicorico, suoi precursori. Oltre a questo risultato, sicuramente il più interessante e macroscopico, si sono potute constatare altre minori modificazioni della composizione intrinseca dei vari campioni di ogni prova e per ambedue le cultivar. In primo luogo, sebbene in quantità appena determinabili, si sono potuti rilevare alcuni composti che in precedenza non era stato possibile rintracciare in nessuna prova svolta sulla Bionda di Parigi e sulla Foglia di Quercia. In particolare, in alcuni trattamenti, sono state individuate tracce degli acidi p-idrossibenzoico, vanillico e siringico (tab. 4 e 5). Tuttavia, la conseguenza più interessante della procedura idrolitica, era consistita nella liberazione di acido caffeico dai suoi due precursori. Si può constatare come esso nella cultivar a foglia verde (fig. 14) costituisse l'88 - 98% degli acidi fenolici totali che riportato in termini di concentrazione, significava un campo di variabilità compreso tra 9,41 mg/g s.s. (S) e 16,13 mg/g s.s. (S+CO<sub>2</sub>).

Nella lattuga Foglia di Quercia (fig. 14) l'idrolisi determinava un medesimo effetto nel senso che l'acido clorogenico e il cicorico con l'idrolisi dei legami esterei liberavano acido caffeico. Questa molecola, nelle sei diverse prove sperimentali, arrivava a costituire tra il 93 e il 98% della composizione in acidi fenolici totali, con un intervallo compreso tra 22,48 mg/g s.s. (S) e 32,25 mg/g s.s. (L).

Tabella 4. Contenuto di acidi fenolici coniugati minori ( $\mu\text{g/g}$  s.s.) in foglie di lattuga verde cresciuta in differenti condizioni ambientali.

	<b>C</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>S+CO<sub>2</sub></b>	<b>L+CO<sub>2</sub></b>
Acido gallico	14,5 c*	47,9 a*	17,5 c*	nd	24,5 b	nd
Acido protocatecuico	23,2 b*	18,5 bc*	37,3 a	13,5 c	18,8 bc	15,7 bc*
Acido <i>p</i> -idrossibenzoico	23,7 a	8,1 b*	25,3 a	7,6 b	28,9 a	nd
Acido vanillico	24,9 a	7,6 b	25,2 a	nd	nd	nd
Acido siringico	22,2 a	nd	29,4a	nd	14,4 b	nd
Acido cumarico	98,0 b*	51,5 d	134,9 a*	69,8 c	103,9 b*	81,8 bc
Acido ferulico	37,4 a	nd	27,9 b	14,3 c	20,0 bc	nd

nd, non determinabile.

C, controllo; S, salinità; L, luce; nd, non determinabile. In ciascuna riga lettere differenti indicano valori significativamente diversi per  $P \leq 0.05$ . Per ciascun

trattamento il segno \* indica valori significativamente diversi rispetto alla varietà rossa per  $P \leq 0.05$ .

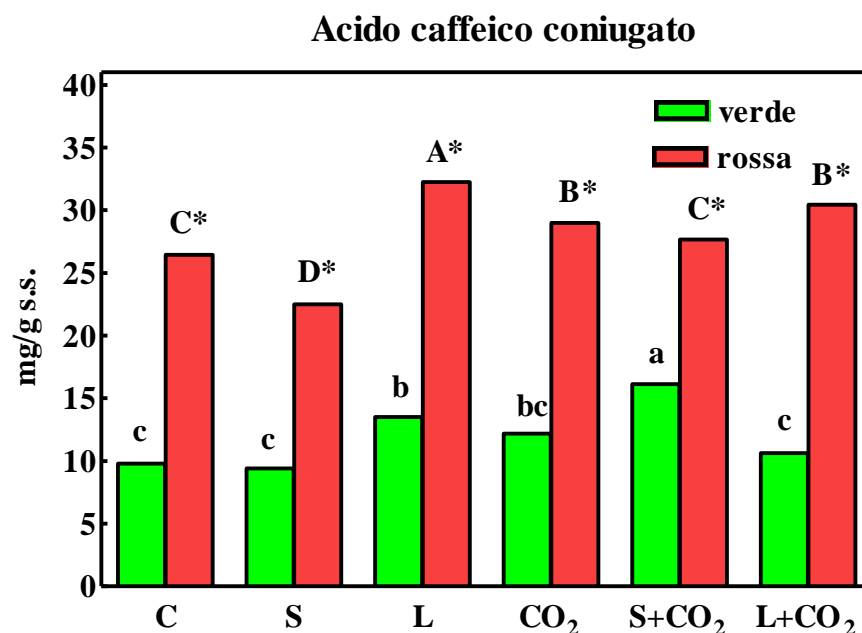
Tabella 5. Contenuto di acidi fenolici coniugati minori ( $\mu\text{g/g}$  s.s.) in foglie di lattuga rossa cresciuta in differenti condizioni ambientali.

	<b>C</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>S+CO<sub>2</sub></b>	<b>L+CO<sub>2</sub></b>
Acido gallico	110,7 A*	7,8 E*	69,1 B*	46,7 C*	28,5 D	nd
Acido protocatecuico	68,8 A*	48,2 B*	nd	nd	nd	83,5 A*
Acido <i>p</i> -idrossibenzoico	nd	18,8 B*	nd	nd	nd	45,5 A
Acido siringico	nd	11,6*	nd	nd	nd	nd
Acido cumarico	51,5 C*	49,1 C	87,8 A*	59,4 B	62,9 B*	80,5 A
Acido ferulico	7,1 D	nd	44,6 A	30,1 B	23,5 C	nd

nd, non determinabile.

C, controllo; S, salinità; L, luce; nd, non determinabile. In ciascuna riga lettere differenti indicano valori significativamente diversi per  $P \leq 0.05$ . Per ciascun trattamento il segno \* indica valori significativamente diversi rispetto alla varietà verde per  $P \leq 0.05$ .

Figura 14. Contenuto di acido caffeico coniugato (mg/g s.s.) in foglie di lattuga verde e rossa cresciuta in differenti condizioni ambientali.



#### 7.9 - Flavonoidi

Lo studio della composizione in flavonoidi ha mostrato la presenza di nove composti, di cui quattro rappresentati da agliconi e cinque da forme glucosidiche. Il contenuto di questi composti nelle due cultivar era diverso e cambiava anche tra i trattamenti all'interno di una stessa lattuga. Nelle prove svolte su lattuga verde (tab. 6) i composti riscontrati in tutte e sei le prove, pur con valori differenti sono stati luteolina-7-O-glucoside, quercetina-3-O-glucoside, miricetina, quercitrina e quercetina-3-O-glucuronide. Gli altri, in alcuni trattamenti, non era stato possibile determinarli. Nelle prove, invece, della lattuga Foglia di Quercia (tab. 7), in tutte e sei le condizioni sperimentali erano stati individuati i seguenti composti: luteolina-7-O-glucoside, quercetina-3-O-glucoside, quercetina-3-O-glucuronide, quercetina, campferolo. I composti riscontrati più frequentemente e con valore percentuale sulla composizione totale più alto nelle varie prove della cultivar verde erano stati (fig. 15):

luteolina-7-O-glucoside, quercetina-3-O-glucoside, rutina e luteolina. L'andamento era comunque molto diverso nelle prove e meno regolare rispetto a quanto emerso dall'analisi dei singoli acidi fenolici. Degno di nota è comunque il riscontro della presenza cospicua di quercetina-3-O-glucuronide che mostrava valori percentuali assai diversi nelle sei prove: 84 e 85% nelle tesi C ed S, 73% nella prova L e 45, 39 e 32%, rispettivamente, per le tesi CO<sub>2</sub>, S+CO<sub>2</sub> ed L+CO<sub>2</sub>. Nella tesi CO<sub>2</sub> la quercetina è risultato il composto principale (46% del totale), mentre nelle altre due prove il composto principale è risultato essere la luteolina, con valori del 53 e del 54%, rispettivamente.

Dall'osservazione, invece, dei dati ottenuti per i vari trattamenti della lattuga rossa (fig. 15), è stato possibile mettere in luce la presenza costante in tutte e sei le prove della quercetina-3-O-glucuronide con percentuali sulla composizione totale variabili dal 65 all'85%. Nelle tre prove S, L, CO<sub>2</sub>, il secondo composto era rappresentato dalla quercetina (20, 16 e 19% del totale dei flavonoidi). Nelle prove S+CO<sub>2</sub> e L+CO<sub>2</sub> il secondo composto per quantità era la luteolina con valori, rispettivamente del 25 e del 26% del totale.

Tabella 6. Contenuto di flavonoidi minori ( $\mu\text{g/g}$  s.s.) in foglie di lattuga verde cresciuta in differenti condizioni ambientali.

	<b>C</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>S+CO<sub>2</sub></b>	<b>L+CO<sub>2</sub></b>
Rutina	23,3 c	nd	351,1 a*	61,2 b*	12,2 d	373,4 a*
Quercetina-3-O-glucoside	55,9 c	183,6 a	36,0 d	61,8 c	122,3 b	50,7 c
Miricetina	15,6 c	11,9 c	102,0 a*	37,9 b	27,7 b	29,5 b*
Quercitrina	6,2 e*	44,5 b*	207,4 a*	13,8 d*	28,4 c	21,5 c*
Quercetina	nd	19,7 c	12,6 d	2.161,5 a	66,3 b	25,0 c
Luteolina	nd	nd	27,3 c*	17,2 c*	4.016,6 a*	2.750,6 b*
Campferolo	15,9 c	10,0 d*	83,9 a	nd	51,0 b	20,5 c

nd, non determinabile.

C, controllo; S, salinità; L, luce; nd, non determinabile. In ciascuna riga lettere differenti indicano valori significativamente diversi per  $P \leq 0.05$ . Per ciascun



trattamento il segno \* indica valori significativamente diversi rispetto alla varietà rossa per  $P \leq 0.05$ .

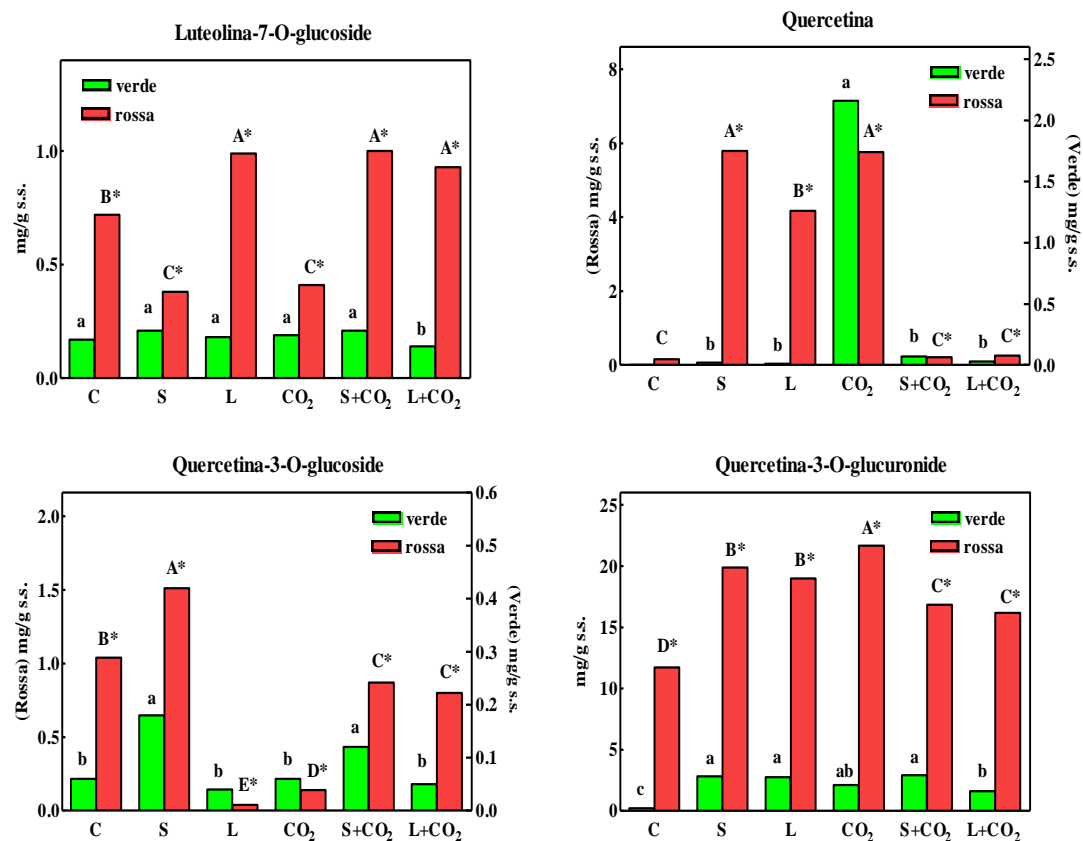
Tabella 7. Contenuto di flavonoidi minori ( $\mu\text{g/g}$  s.s.) in foglie di lattuga rossa cresciuta in differenti condizioni ambientali.

	<b>C</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>S+CO<sub>2</sub></b>	<b>L+CO<sub>2</sub></b>
Rutina	nd	nd	522,9 B*	656,1 A*	14,0 D	105,2 C*
Miricetina	15,0 C	nd	112,8 B*	nd	22,3 C	213,0 A*
Quercetrina	108,0 D*	336,1 B*	550,3 A*	193,0 C*	nd	36,1 E*
Luteolina	nd	43,7 C*	38,8 C*	40,5 C*	6.804,7 A*	6.300,5 B*
Campferolo	9,0 D	298,2 B*	71,4 C	339,8 A*	9,3 D*	13,7 D

nd, non determinabile

C, controllo; S, salinità; L, luce; nd, non determinabile. In ciascuna riga lettere differenti indicano valori significativamente diversi per  $P \leq 0.05$ . Per ciascun trattamento il segno \* indica valori significativamente diversi rispetto alla varietà verde per  $P \leq 0.05$

Figura 15. Contenuto di flavonoidi maggiori (mg/g s.s.) in foglie di lattuga verde e rossa cresciuta in differenti condizioni ambientali.



## CAPITOLO 8

### Discussione

#### 8.1 - Effetti della salinità

In accordo con i dati rilevati nel presente studio, circoscrivendo questa discussione alla sola classe dei flavonoidi per la cultivar verde e per tutti i composti fenolici della rossa, si può citare quanto riportato da Miladinova et al. (2012) dall'analisi di due cloni di *Paulownia* sp. In questo studio i cloni *P. tomentosa* × *fortunei* (clone TF01) e *P. elongata* × *fortunei* (clone EF02) sono stati fatti crescere in coltura idroponica in presenza di tre livelli di salinità: 50, 100 e 200 mM di NaCl. Dallo studio emergeva come in entrambi i cloni, ma principalmente nell'EF02, fosse incrementata l'attività dell'enzima cardine del metabolismo secondario, la fenilalanina-ammonio liasi (PAL). Inoltre, in entrambi, al crescere della salinità aumentavano parallelamente i livelli di acidi fenolici e flavonoidi totali contenuti nelle foglie. Tutto questo era stato giustificato come evidenza del fatto che mutamenti nella sintesi di metaboliti secondari costituirebbero una risposta allo stress ossidativo. Infatti, i composti fenolici giocano un ruolo principale nell'eliminazione dei radicali liberi, nell'abbattimento dell'ossigeno singoletto e nella decomposizione dei perossidi. In un altro studio di Rajamane et al. (2014) condotto su *Simarouba glauca*, piantine di cinque mesi erano state esposte a vari livelli di NaCl (EC pari a 4, 8, 12, 16 mmhos/cm). Anche in questa specie il contenuto di polifenoli subiva un incremento con l'aumentare della concentrazione del sale in soluzione. Questo fenomeno mostra come la presenza di una elevata concentrazione salina possa indurre una risposta del metabolismo secondario atta a contrastare lo stress ossidativo. Pur studiando composti differenti nella reazione alla pressione ambientale rappresentata dalla salinità, anche nel lavoro di Odjegba et al. (2013) eseguito su *Acalypha wilkesiana* era stato evidenziato un aumento dell'attività del metabolismo secondario e in particolare delle saponine. La consistente presenza di sale determinerebbe alcuni effetti sulla

pianta come inibizione della fotosintesi, tossicità da Na e carenza idrica. Tutto questo avrebbe quale conseguenza un'eccessiva formazione di ROS come risultato dell'ostacolo al trasporto elettronico cellulare all'interno dei vari compartimenti subcellulari. Uno degli effetti di tipo meccanico causati dalla presenza di un'alta concentrazione di NaCl è l'induzione alla chiusura degli stomi per il mantenimento di un equilibrio osmotico interno, fenomeno che tuttavia ha come conseguenza il minore ingresso di CO<sub>2</sub> nella pianta. Ciò determina un ostacolo alla fissazione del carbonio che di conseguenza espone i cloroplasti a un eccesso di energia di eccitazione e al contempo determina una riduzione nel sistema di trasporto elettronico fotosintetico con associata produzione di ROS e danno ossidativo. La fotorespirazione è stimolata dal basso rapporto CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> all'interno del cloroplasto e anche tale processo metabolico determina la liberazione di ROS. In *A. wilkesiana* il ruolo di protezione contro lo stress ossidativo sarebbe svolto dalle saponine, mentre in *L. sativa* e nelle specie dei due studi sopra citati, questa funzione sarebbe compiuta da acidi fenolici, flavonoidi e antocianine. È da evidenziare inoltre come la presenza nel substrato di coltura di una concentrazione di sale superiore a quella riscontrabile in una condizione definibile nella norma provochi una serie di risposte fisiologiche, biochimiche e meccaniche nella pianta a tutta una serie di stimoli che tale condizione determina. La pianta attiva la chiusura degli stomi delle foglie per compensare la pressione osmotica agente nella direzione del suolo, cosa che rischierebbe di portare alla disidratazione dell'organismo che a questo fine provvede limitando le perdite evapotraspirative. Questo fenomeno che ha come immediata conseguenza il minore ingresso di CO<sub>2</sub> e perciò una ridotta assimilazione di carbonio esogeno, determina delle importanti modificazioni nel metabolismo. L'induzione della fotorespirazione a causa della bassa concentrazione di biossido di carbonio rispetto a quella dell'ossigeno comporta la produzione di ROS che devono essere eliminate per contenere il danno ossidativo che esse determinano. La pianta potrebbe indirizzare l'utilizzo del carbonio del metabolismo primario verso quello secondario allo scopo di prodursi una serie di molecole che possano difendere il suo sistema di organelli cellulari dai danni causati dai radicali liberi formatisi. Tale ruolo può essere assunto dai composti fenolici appartenenti alle tre classi esaminate. È evidente, anche attenendosi agli esempi

di lavori di altri autori cui si è in precedenza fatto riferimento, che le modificazione del metabolismo secondario sono specie-dipendenti anche per quanto concerne la scelta di sintetizzare una classe di composti piuttosto che un'altra. Secondo una ricerca di Ramakrishna et al. (2011), l'ambiente salino determinerebbe la disidratazione cellulare che a sua volta provocherebbe stress osmotico e la rimozione di acqua dal citoplasma, risultando in una riduzione di volume del citosol e dei vacuoli. Un lavoro di Parida e Das (2005) mette in luce come le antocianine aumentino in risposta a questo tipo di influenza abiotica. All'opposto, Daneshmand et al. (2010) hanno constatato come tale pressione ambientale comportasse una riduzione del contenuto di questi composti in specie sensibili alla salinità. Petrusa e Winicow (1997) analogamente rilevavano come piante di erba medica alotolleranti raddoppiassero rapidamente la sintesi di prolina nell'apparato radicale, mentre al contrario gli esemplari sensibili subissero un incremento meno tempestivo. Più genericamente Dixon e Paiva (1995) e Muthukumarasamy et al. (2000) hanno constatato come la sintesi e l'accumulo di polifenoli sia solitamente stimolato in risposta a stress biotici e abiotici. In modo simile, Navarro et al. (2006) hanno dimostrato come si verificasse un incremento del contenuto di polifenoli totali in peperone rosso cresciuto a un livello di salinità moderato. In uno studio di Mane et al. (2010) eseguito su *Cymbopogon nardus* in presenza di vari livelli di concentrazione di NaCl (25, 50, 100, 200, 300 mM), si osservava un incremento del contenuto in polifenoli totali alle due concentrazioni superiori, laddove ai valori di NaCl inferiori si aveva la tendenza contraria. In corrispondenza dei due livelli più alti di salinità l'incremento di polifenoli totali seguiva linearmente l'aumento del contenuto in NaCl. Quanto constatato dagli Autori confermerebbe la tesi sostenuta in precedenza che l'induzione della sintesi di metaboliti secondari incrementata dalla presenza di un superiore livello salino sia attuata allo scopo di tollerare questa condizione e gli effetti dalla stessa provocati. A questo proposito, Karadge (1981) osservava invece una tendenza contraria in *Portulaca oleracea* nella quale, all'aumentare dei livelli di NaCl nel mezzo di crescita, faceva riscontro una diminuzione del contenuto di polifenoli nelle foglie, indicando la suscettibilità alla presenza del sale di questa specie. Parida et al. (2002), invece, constatavano un accumulo di polifenoli in individui di *Bugriera parviflora*

sottoposta a livelli crescenti di salinità. Un lavoro recente di Singh et al. (2015) compiuto su piante di granturco di due settimane cresciute a diversi livelli di salinità (50, 100, 150 e 200 mM di NaCl) ha messo in luce, tra gli altri aspetti emersi, come il contenuto di composti fenolici totali incrementasse in presenza della più alta concentrazione salina. Allo stesso tempo il livello di acidi fenolici raggiungeva il valore più alto in presenza di 150 mM di cloruro di sodio. Secondo Das et al. (1990), il danno provocato da un substrato salino può essere anche attribuito allo stress idrico o a una sorta di siccità fisiologica generata da NaCl e nello studio più recente di Singh et al. (2015) questo fenomeno sarebbe convalidato dalla diminuzione nell'efficienza di utilizzo idrico e dal relativo contenuto di acqua. L'accumulo di composti fenolici a seguito di esposizione a maggiori concentrazioni di sale era due volte superiore a quello dei campioni di controllo. I fenoli, si può affermare, costituiscono una parte dei soluti cellulari e contribuiscono al mantenimento di un ambiente riducente nel sistema. La pressione esercitata dal sale esplica il suo effetto mediante la perossidazione della membrana. Di conseguenza un incremento nell'accumulo di composti fenolici potrebbe essere un meccanismo cellulare di adattamento per contrastare i radicali liberi dell'ossigeno e per prevenire il danno a livello subcellulare che può verificarsi durante lo stato di squilibrio biochimico e fisiologico.

Nella cultivar a foglia verde la mancata variazione nella sintesi di acidi fenolici potrebbe avere le sue motivazioni in qualche fenomeno d'inibizione conseguente alla variazione di equilibri interni successivi allo stress osmotico che potrebbe avere determinato la già osservata possibile chiusura stomatica nel tessuto fogliare con conseguente minore ingresso di CO<sub>2</sub> e dunque accumulo di carbonio. Non avendo a disposizione trattamenti con concentrazioni di NaCl inferiori (o superiori) non si può escludere che nella lattuga si fosse verificato un fenomeno analogo a quanto osservato da Singh et al. (2015) su mais, in cui la sintesi di acidi fenolici seguiva linearmente l'aumento di concentrazione del sale fino a un valore di 150 mM, iniziando poi a decrescere in presenza di 200 mM di NaCl, valore identico a quello utilizzato. La cultivar rossa, invece, ha messo in atto un tipo di risposta differente; infatti, essa presentava quasi 3 mg/g s.s. in più rispetto al controllo. Questo comportamento differente potrebbe essere motivato da un sistema di

reazione alla pressione ambientale esercitata dal sale che potrebbe rivelarsi dipendente dalla cultivar. Quanto riscontrato per gli acidi fenolici assume una dimensione differente alla luce di quanto mostrato dall'analisi dei flavonoidi. A livello quantitativo la cultivar a foglia verde, se per i primi composti si era dimostrata debole nella risposta, in questo caso aveva fornito una reazione proporzionalmente superiore alla cultivar rossa. Infatti, l'una aveva sestuplicato il proprio contenuto, l'altra l'aveva raddoppiato. Questi risultati lascerebbero presupporre che la lattuga a foglia verde abbia preferito dirottare più risorse verso il metabolismo secondario per la sintesi di flavonoidi che non di acidi fenolici. Si può porre in evidenza come la risposta alla presenza di sale sia dipendente dalla cultivar oggetto di studio e come la risposta biosintetica, con riguardo agli acidi fenolici per la lattuga verde, avrebbe potuto essere differente a concentrazioni di NaCl inferiori o superiori a quella impiegata.

## 8.2 - Effetti dell'intensità luminosa

L'effetto della radiazione luminosa, intesa sia come densità di flusso fotonico fotosintetico sia come tipologia di lunghezza d'onda, è ben nota rappresentare un fattore fisico condizionante la produzione di metaboliti. In uno studio di Anasori e Asghari (2008) è stato osservato come la luce stimolasse la biosintesi di composti secondari come il gingerolo e lo zingiberene in *Zingiber officinale* in colture da callo. Chalker-Scott e Fnychigami (1989) avevano in precedenza constatato una correlazione positiva tra intensità luminosa e livello di composti fenolici. All'opposto, ma al contempo a sostegno di questa tesi, Larsson et al. (1986) avevano osservato un decremento nella presenza di tannini e glicosidi fenolici in foglie di salice cresciuto in condizione di ombreggiamento. Altri lavori hanno evidenziato l'influenza rilevante della radiazione luminosa sulla biosintesi di antociani in colture di fragola (Sato et al., 1996), carota (Narayan et al., 2005) e *Centaurea cyanus* (Kakegawa et al., 1991). La radiazione UV-B in alcuni studi incrementava la sintesi di flavonoidi e l'attività dell'enzima PAL, parallelamente ad un decremento del contenuto in clorofille (Liang et al., 2006). A sostegno di quanto ipotizzato a proposito degli effetti delle diverse intensità luminose sulla stimolazione alla biosintesi di prodotti secondari, è possibile prendere in esame il lavoro di Ghasemzadeh et al. (2010) svolto su due varietà di *Z. officinale* nel quale, tra gli altri aspetti indagati, erano presi in esame i valori totali di fenoli e flavonoidi risultati dopo coltura a 4 diverse intensità di luce: 310, 400, 630 e 790  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ . In entrambe le varietà, i livelli più elevati di fenoli totali sono stati riscontrati in corrispondenza della PAR più alta. Un lavoro più articolato di Ouzounis et al. (2015) ha mostrato gli effetti dell'intensità luminosa e della durata di irraggiamento della luce blu sulla biosintesi di acidi fenolici, flavonoidi e pigmenti in due cultivar di *L. sativa*, di cui una a foglia verde (Batavia) e una a foglia rossa (Lollo rossa). I risultati hanno evidenziato, soprattutto con riferimento alla cultivar rossa, un incremento rispetto al controllo di alcuni composti appartenenti alle stesse tre categorie di fenoli oggetto del nostro lavoro, sotto certe combinazioni



d'intensità e durata dell'esposizione alla luce blu. I valori ottenuti ponevano in evidenza come, tuttavia, la sintesi di questi metaboliti secondari non necessariamente fosse dipendente dalla luce blu, ma come invece essi potessero essere autonomamente influenzati. L'effetto era più rimarchevole nella lattuga Lollo rossa, indicando di conseguenza il legame tra il fenomeno e la cultivar. In aggiunta, sembrerebbe che la luce blu in lattuga attivi il funzionamento dell'enzima PAL (Heo et al., 2012) e l'espressione del corrispondente gene codificante sarebbe stimolata proprio dalla luce LED blu monocromatica, stando a quanto riportato da Son et al. (2012). Sempre in accordo con queste osservazioni si colloca un lavoro di Odabas et al. (2009) svolto su *Hypericum perforatum*. In questo studio, ad essere indagati erano gli effetti di due differenti intensità luminose, abbinate ciascuna a un livello termico, sulla sintesi di tre metaboliti: iperforina, ipericina e pseudoipericina. I due trattamenti cui era sottoposto *H. perforatum* erano rispettivamente 803,4  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  di PAR a 24°C e 1.618,6  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  a 32°C. Tutti e tre i composti elencati mostravano un incremento significativo in presenza della PAR più elevata. La funzione dei metaboliti secondari si ritiene sia l'adattamento delle specie vegetali all'ambiente in cui si trovano a vivere. Questi composti possono tutelare le piante da vari tipi di situazioni di stress o pericolo e in vario modo possono prevenire un possibile grave danno all'apparato fogliare causato dalla radiazione luminosa sintetizzando composti in grado di assorbire la radiazione UV. Briskin e Gawienowski (2001) seguendo un differente ragionamento in un loro lavoro su *H. perforatum*, dopo aver riscontrato l'incremento lineare di ipericina con l'innalzamento della PAR da un valore iniziale di 106  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  fino a 402  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ , ipotizzavano che l'attività fotosintetica potenziata dall'elevata PAR risultasse in una maggiore assimilazione di carbonio e di conseguenza in una più cospicua sintesi di ipericina nelle foglie. Altri autori hanno attribuito la maggiore biosintesi di metaboliti secondari da parte di piante esposte a elevate PAR a un maggiore tasso di fotosintesi netta. Da questa supposizione si potrebbe evincere come un surplus di carbonio che si renda disponibile per la pianta, la quale al contempo si trovi ad affrontare una condizione di stress, possa essere destinato al metabolismo secondario anziché alla produzione di composti fondamentali per la crescita. Sharafzadeh (2015) in uno studio condotto su basilico e altre specie della famiglia delle *Lamiaceae*,

ha riportato come su *Ocimum basilicum* l'effetto della luce sia rimarchevole. Un'illuminazione con luce bianca e rossa si è dimostrata promotrice della sintesi di acido rosmarinico, sostanza fenolica che insieme agli acidi caffeico e cichorico è tra le più rappresentate in questa pianta. Al contrario, l'irradiazione con sola luce blu non determinava lo stesso risultato. Per quanto riguarda invece il livello di intensità luminosa, le piante di basilico erano state sottoposte a diversi regimi di PAR. Al livello più basso (circa 61,3  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ ) la fotosintesi risultava nettamente inibita. Non si apprezzavano invece incrementi o decrescite con il passaggio da 288  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  (assenza di ombreggiamento), a 156  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  (25% di ombreggiamento). Inoltre, le diverse condizioni di illuminazione favorivano o inibivano la biosintesi di alcuni metaboliti tipici del basilico: il linalolo e l'eugenolo risultavano favoriti da una maggiore intensità luminosa, laddove il metileugenolo si avvantaggiava di una minore intensità di luce. Risultati opposti a quelli ottenuti dal nostro lavoro sono stati conseguiti da Ibrahim e Jaafar (2011) su un'altra lamiacea, la specie *Orthosiphon stamineus*. In questo studio piantine di 14 giorni sono state sottoposte a 4 differenti livelli di PAR (225, 500, 625 e 900  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ ) per 12 settimane. Il livello di fenoli e flavonoidi totali decresceva all'aumentare del livello d'intensità luminosa. La concentrazione di polifenoli, anche in questo caso, era correlata con le condizioni ambientali, nella fattispecie con l'intensità luminosa. Questo parametro ambientale non ha effetto di regolazione esclusivamente su crescita e sviluppo della pianta, ma anche sulla sintesi di composti primari e secondari. La biosintesi di acidi fenolici richiede illuminazione e anche la formazione di flavonoidi è assolutamente dipendente dall'illuminazione laddove il loro tasso biosintetico è correlato con l'intensità di luce. Tuttavia, le varie specie possono fornire risposte differenti e opposte per quanto riguarda la produzione di metaboliti secondari. A livello generale, seguendo l'ipotesi delle risorse disponibili si può prevedere una riduzione nella destinazione di carbonio alla produzione di composti secondari quando il guadagno dell'elemento è limitato dalla disponibilità di nutrienti, situazione che si realizza tipicamente in condizione di bassa irradiazione. Tale previsione è basata sugli effetti delle condizioni ambientali esercitati sul bilancio carbonio-nutrienti. Tuttavia, la produzione di metaboliti secondari potrebbe incrementare o diminuire a seconda del tipo di pianta. Ad esempio, Coelho et

al. (2007) osservavano un aumento del livello fogliare di metilaxantina in *Ilex paraguariensis*, mentre Zavala e Ravetta (2001) constatavano il decremento di resina nelle foglie di *Grindelia chiloensis*. La lunghezza d'onda contenuta dalla radiazione UV-B ha la caratteristica di essere biologicamente attiva, ossia in grado di determinare variazioni a livello di processi biochimici e nella struttura delle piante. La prima risposta messa in atto dagli organismi vegetali è la produzione di flavonoidi che sono composti dotati di struttura molecolare capace di assorbire le radiazioni ultraviolette. Questo è chiaramente reso possibile da grazie all'incremento della trascrizione di alcuni enzimi fondamentali del percorso biosintetico dei flavonoidi, come ad esempio la calcone sintasi e la calcone isomerasi. I cambiamenti indotti dalla luce UV-B possono anche assumere una fondamentale importanza poiché, se indotti a bassa intensità, possono generare fattori di difesa tramite i quali gli organismi vegetali sono posti nella condizione di acquisire un grado di tolleranza alle stesse radiazioni quando presenti a un maggiore livello. In questo senso, molte specie vegetali sintetizzano fattori di protezione competenti nell'assorbimento dell'eccesso di radiazioni UV-B, come i flavonoidi, la cui produzione è regolata da particolari recettori della luce UV-B che alla presenza di certi livelli della stessa innescano una serie di segnali che stimolano l'avvio della produzione di tali sostanze.

Le modificazioni provocate da 300  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  aggiunte alla radiazione fotosinteticamente attiva avevano stimolato la sintesi di acidi fenolici in entrambe le cultivar, indicando come la risposta, in questa circostanza non fosse dipendente dalla cultivar. Il maggiore PPFD potrebbe avere agito su entrambe nella direzione di una stimolazione a produrre composti secondari, probabilmente a seguito di un incremento dell'assimilazione di carbonio motivabile da un parallelo aumento del tasso fotosintetico netto. Insieme a questa spiegazione si potrebbe anche supporre che la sintesi di queste molecole sia stata, oltre che conseguenza della maggiore disponibilità di carbonio, anche motivata dalla necessità di avere a disposizione agenti antiossidanti che fossero in grado di salvaguardare dal danno ossidativo le strutture subcellulari direttamente interessate dalla produzione di ROS, a loro volta generate dall'eccesso di energia di eccitazione accumulata a livello dei fotosistemi. A favore di queste osservazioni si pongono anche il dato sulla sintesi di

flavonoidi che per ambedue le cultivar mostrava un significativo incremento (di circa sei volte nella verde e di circa due nella rossa) rispetto al controllo e quello concernente le antocianine, composti la cui biosintesi è stimolata dall'irradiazione. Questi composti, infatti, hanno registrato un aumento di circa 9 mg/g s.s. Questo ultimo dato è in accordo con quanto osservato da altri Autori in precedenza, i quali avevano già posto in evidenza come le antocianine abbiano un ruolo come antiossidanti (Rice-Evans et al., 1997; Neill e Gould, 2003) e una ben precisa funzione fotoprotettiva. Secondo quanto riportato da Hatier e Gould (2009), queste molecole fornirebbero una protezione alle strutture cellulari fotosinteticamente attive dall'energia in eccesso che, in caso contrario, determinerebbe fotoinibizione - ovvero la decrescita del guadagno quantico - e fotoossidazione. Non è da trascurare, inoltre, la capacità da loro mostrata di assorbire la radiazione ultravioletta.

### 8.3 - Effetti del biossido di carbonio

Lo studio delle risposte di varia natura offerte dalle specie vegetali a concentrazioni di CO<sub>2</sub> superiori a quella ambientale che attualmente è calcolata intorno ai 400 ppm è stato oggetto di diversi lavori. Chaturvedi et al. (2009) hanno simulato alcuni cambiamenti nei parametri ambientali, tra cui la concentrazione atmosferica di CO<sub>2</sub>, per osservare la reazione degli organismi vegetali della zona artica. Bazzaz et al. (1995) hanno messo in luce come la risposta all'aumento di concentrazione del gas atmosferico sia variabile da specie a specie. Ghasemzadeh e Jaafar (2011) hanno osservato come alti livelli di CO<sub>2</sub> generalmente portassero all'innalzamento del tasso fotosintetico netto a motivo dell'incremento dell'attività dell'enzima Rubisco e potessero alterare la crescita della pianta e l'accumulo di composti secondari. Stando a quanto osservato da Korner et al. (2007), la stimolazione del processo fotosintetico e la crescita dell'organismo vegetale possono non essere linearmente correlati. Estiarte et al. (1999) annoverano il tasso di biossido di carbonio presente in concentrazioni superiori a quelle ambientali tra i vari fattori condizionanti i livelli di flavonoidi e altri composti fenolici. L'utilizzo di assimilati fotosintetici per originare metaboliti secondari contenenti carbonio, quali sono appunto i composti fenolici, è in dipendenza da fattori di tipo genetico e da condizioni ambientali contingenti. Secondo quanto constatato da Booker e Mayer (2001), in presenza di un'elevata concentrazione di CO<sub>2</sub> che determini un innalzamento nella riserva di carbonio oppure in circostanze di carenza nutritiva che diminuisca la richiesta dell'elemento, il carbonio sarebbe reso disponibile in quantità eccedenti rispetto a quanto non sia richiesto per i fabbisogni di crescita e mantenimento. Esso, in questo modo, potrebbe essere devoluto alla sintesi di composti secondari tra cui flavonoidi, protoantocianidine, lignina e altre sostanze fenoliche. All'opposto, verosimilmente, una situazione di disponibilità nutritive che promuova un'ottimale crescita, potrebbe risultare in una meno intensa utilizzazione dei prodotti fotosintetici per il metabolismo secondario. La biosintesi di

fenilpropanoidi e composti derivati è in diretta competizione con la sintesi proteica e di conseguenza con la crescita della pianta poiché entrambi i processi condividono un medesimo precursore, la fenilalanina. Bryant et al. (1983) hanno evidenziato come il metabolismo secondario fosse connesso a quello primario in proporzione ai livelli ai quali i substrati erano richiamati dai percorsi metabolici primari e ricollocati nelle rotte biosintetiche secondarie. A causa di questo fenomeno diviene comprensibile la ragione per cui differenti fattori ambientali influenti su crescita, fotosintesi e altre fasi del metabolismo primario possono anche condizionare quello secondario. Diverse osservazioni sono in accordo con quanto riscontrato nel nostro lavoro, dunque in linea con l'effetto stimolante indotto dalla maggiore concentrazione di CO<sub>2</sub> nell'ambiente di crescita sul metabolismo secondario. Un esperimento su *Pinus taeda* ha dimostrato come la concentrazione di fenoli solubili, catechine e protoantocianidine sia cresciuta dell'11% negli estratti degli aghi in seguito all'esposizione a trattamenti con concentrazioni di CO<sub>2</sub> maggiori di quella ambientale (Booker e Mayer, 2001). In condizioni ottimali di fornitura idrica, Stuhlfauth e Fock (1990) hanno osservato come una concentrazione di CO<sub>2</sub> triplicata rispetto al valore ambientale avesse aumentato il peso della biomassa secca in *Digitalis lanata* del 63% e come il medesimo livello del gas avesse accresciuto dell'83% lo stesso parametro in condizioni di carenza idrica. Inoltre, nelle due diverse condizioni di disponibilità idrica la sintesi di un altro composto secondario tipico della specie, la digossina, era aumentata, in un caso dell'11% e nell'altro del 14%. Coley et al. (2002) conducendo uno studio su alcune specie tropicali nell'area di Panama, dopo averle sottoposte a una concentrazione di CO<sub>2</sub> doppia in paragone a quella ambientale, hanno osservato che il contenuto fenolico delle foglie cresceva mediamente del 48%. L'accumulo di biomassa non era influenzato, anche se amido, carboidrati non strutturali e il rapporto C/N mostravano un aumento. Zobayed e Saxena (2004), lavorando su *H. perforatum*, osservavano come la coltivazione di questa pianta in un ambiente controllato con concentrazione di CO<sub>2</sub> pari a 1.000 ppm determinasse un incremento del 174% del tasso fotosintetico netto e del 107% della biomassa secca e come la biosintesi dei tre composti secondari tipici della specie (iperforina, ipericina e pseudoipericina) raddoppiasse. Ghasemzadeh e Jaafar (2011) in una ricerca su due varietà di *Z. officinale* cresciute a livelli di

CO<sub>2</sub> pari a 400 e 800 ppm, riscontravano come entrambe subissero un incremento nel contenuto totale di flavonoidi, fenoli, carboidrati solubili, amido e biomassa linearmente con l'aumentare del livello del gas atmosferico. Un altro lavoro condotto su fragola (*Fragaria* × *ananassa* Duchesse cv Honeoye) da Wang et al. (2003) cresciuta alla presenza di tre livelli di CO<sub>2</sub>, di cui una ambientale, una con aggiunta di 300 ppm e un'ultima con aggiunta di 600 ppm per un periodo di 28 mesi, aveva come scopo lo studio degli effetti di questo parametro ambientale sulla sintesi di acidi fenolici, flavonoidi e antocianine. I risultati mostrano un incremento della sintesi dei composti appartenenti a tutte e tre le classi fenoliche. Un grosso contributo alla comprensione delle conseguenze legate all'esposizione a livelli superiori a quelli atmosferici di CO<sub>2</sub> è fornito da uno studio di Ibrahim e Jaafar (2012) eseguito su piantine di *Eleais guineensis* (palma da olio), esposta a tre differenti concentrazioni del componente atmosferico (400, 800 e 1.200 ppm) per 15 settimane. Quello che gli Autori riscontravano al termine del periodo sperimentale era l'incremento quantitativo lineare di flavonoidi e fenoli totali al crescere del livello di CO<sub>2</sub>. Questi risultati possono essere spiegati seguendo alternativamente due teorie: l'ipotesi del bilancio del carbonio (Bryant et al., 1992) e l'ipotesi dell'equilibrio tra crescita e differenziazione. Entrambe le teorie, comunque, sostengono che un'elevata concentrazione di CO<sub>2</sub> supporti un incremento nella disponibilità di carbonio che è accumulato sotto forma di carboidrati non strutturali totali e metaboliti secondari a base carbonica nel momento in cui la quota di carbonio fornita ecceda le richieste per la crescita (Peñuelas e Estiartes, 1998). In presenza di livelli ottimali di CO<sub>2</sub>, contemporaneamente a risorse nutritive limitanti che esercitano un effetto inibente sulla crescita a un livello più marcato che nei riguardi della fotosintesi, gli organismi vegetali mostravano un aumento del rapporto C/N e un eccesso di carboidrati non strutturali (Reichardt et al., 1991; Felgines et al., 2000). Baas et al. (1989) per spiegare l'incremento della sintesi di metaboliti secondari a base di carbonio e di antiossidanti alla presenza di alti livelli di biossido di carbonio, ipotizzavano che i carboidrati totali non strutturali in eccesso rispetto a quelli richiesti per la produzione di proteine, fossero il fattore primario che influisse sull'aumento di metaboliti secondari a base carbonica alla presenza di alte concentrazioni di CO<sub>2</sub>. Quanto invece osservato da Jones e Hartley (1999)

portava questi Autori a porre in evidenza il contributo dell'amminoacido fenilalanina in quanto precursore condiviso dai processi di sintesi proteica e metabolismo secondario. La competizione tra proteine e composti fenolici per la fenilalanina come fattore limitante risulterebbe in un'inversione dei tassi della sintesi proteica e della produzione fenolica e perciò nella reversione del collegamento tra distribuzione di proteine e fenoli. Entrambe queste teorie si basano sulla constatazione che l'incremento di metaboliti secondari in presenza di elevata CO<sub>2</sub> sia un risultato dell'eccesso metabolico di carbonio, privo di costi fisiologici per la crescita. Booker (2000) ha messo in evidenza una correlazione negativa tra composti secondari e crescita, ponendo l'attenzione sul fatto che aumenti del tasso di quest'ultima, alla presenza di risorse nutritive in aumento risultava in una minore quantità di carbonio destinabile al metabolismo secondario. Concludendo, si può affermare che un innalzamento improvviso del livello di CO<sub>2</sub> determina, come già messo in evidenza, un aumento della fotosintesi netta. Questo fenomeno non ha luogo solo come conseguenza della maggiore disponibilità di CO<sub>2</sub>, substrato del processo metabolico in questione, ma anche perché l'enzima Rubisco viene stimolato a far prevalere la sua attività carbossilante su quella ossigenante. Generalmente, è come se si verificasse una sorta di livellamento o addirittura una diminuzione dell'attività fotosintetica in organismi vegetali esposti in modo continuativo ad alti livelli di CO<sub>2</sub>, a motivo di una ottimizzazione nello sfruttamento delle risorse e della loro riallocazione. Questa manifestazione sarebbe una sorta di acclimatazione che viene definita completa nel momento in cui organismi sottoposti ad elevate concentrazioni di CO<sub>2</sub>, trascorso un determinato periodo, ritornano a presentare valori paragonabili a quelli che è possibile rilevare in condizioni atmosferiche normali. Tuttavia, è opportuno e fondamentale porre l'attenzione sul fatto che la risposta delle diverse specie vegetali alle concentrazioni di CO<sub>2</sub> a livello di fotosintesi netta è variabile. In certi casi questo valore può incrementare proporzionalmente, in altri può addirittura essere ridotto oppure, infine, non essere condizionato apprezzabilmente. Dal punto di vista biochimico sono numerose le ipotesi per giustificare l'acclimatazione delle piante a concentrazioni elevate del gas atmosferico in esame. Una di queste riguarda le proprietà catalitiche dell'enzima Rubisco. In piante sottoposte ad alte concentrazioni di CO<sub>2</sub>, la proteina è espressa in



minore quantità e presenta un livello inferiore di attività rispetto alle condizioni atmosferiche. Essendo più ridotto lo stato di attivazione dell'enzima, questo sta a indicare che organismi vegetali esposti a valori superiori di CO<sub>2</sub> riescono a compensare tale carenza di attività e la minor presenza dell'enzima, senza ridurre il processo fotosintetico.

Le due cultivar di lattuga hanno mostrato di aver risposto all'incremento di 300 ppm di CO<sub>2</sub> in senso positivo, avendo evidenziato una stimolazione della biosintesi di acidi fenolici analoga per entrambe. Nello specifico, la cultivar verde presentava un incremento di 1,36 volte e l'altra di 1,46. La maggiore disponibilità del substrato del processo fotosintetico avrebbe dunque stimolato l'attività di assimilazione e questa avrebbe dunque determinato una maggiore disponibilità di carbonio. In concomitanza con una situazione nutritiva ottimale, le piante avrebbero destinato al metabolismo secondario questa risorsa carbonica eccedente e di conseguenza avrebbero favorito la biosintesi di acidi fenolici. Stessa risposta è stata palesata anche dai flavonoidi, per quanto in questo contesto la lattuga verde in proporzione avesse registrato un aumento più cospicuo a paragone della rossa. In conclusione, il fatto che la biosintesi di antocianine sia stata significativamente diminuita potrebbe essere motivato dalla constatazione che a parità di aumento del tasso fotosintetico netto sarebbero da tenere presenti alcune differenze fondamentali. In questa circostanza, infatti, non si sarebbe presentata la necessità di tutelare gli organelli cellulari da un surplus di radiazione, ma solamente da una maggiore quantità di ROS prodotte. La pianta allora avrebbe accordato la preferenza alla sintesi di altri composti fenolici. Come in precedenza messo in evidenza, le antocianine sono specializzate, tra le altre cose, nella protezione dai raggi ultravioletti e dalle radiazioni luminose elevate, mentre la loro attività antiossidante è ampiamente condivisa con molecole rientranti nelle altre due categorie fenoliche oggetto del presente lavoro. In breve, la pianta per la funzione di prevenzione del danno ossidativo e per lo smaltimento del carbonio in eccesso rispetto a quello richiesto per la crescita potrebbe aver preferito dare la precedenza alla biosintesi di acidi fenolici e flavonoidi.

#### 8.4 - Effetti della salinità e del biossido di carbonio

Per l'analisi dei dati forniti da questo trattamento combinato, è opportuno fare riferimento agli effetti determinati dai medesimi fattori presi singolarmente. Partendo dall'analisi delle risposte fornite dalla lattuga a foglia verde, si può osservare come, con riguardo alla sintesi di acidi fenolici, la presenza di CO<sub>2</sub> aveva mostrato di incentivare la loro produzione, mentre l'effetto della salinità non causava alcun effetto sulla sintesi di tali composti. L'azione su questa cultivar era una media tra le due risposte suscitate dai due fattori ambientali quando agenti singolarmente. Nei riguardi della produzione di flavonoidi il risultato era sensibilmente differente. La contemporanea presenza dei due parametri ambientali modificati i quali, quando operanti individualmente, avevano dimostrato di stimolare la produzione di queste sostanze, era risultata in un palese effetto sinergico. In altre parole, la loro presenza simultanea aveva determinato un grado di biosintesi di flavonoidi superiore a quanto ognuno dei due avesse comportato con la sua esclusiva presenza nella camera di crescita. In maniera simile a quanto osservato per la cultivar verde, per quella a pigmentazione rossa la biosintesi degli acidi fenolici quando sottoposta a questo duplice trattamento è essenzialmente consistita nell'interazione tra l'effetto rivelatosi altamente stimolante della CO<sub>2</sub> con quello meno influente dell'NaCl. Per i flavonoidi, diversamente dalla lattuga verde, non si è assistito a un effetto sinergico tra i due fattori ma, al contrario, quanto osservato su questa cultivar si mostrava più come un effetto di inibizione, risultando il livello inferiore a quello determinato dagli stessi parametri ambientali quando operanti come unici fattori alterati. Diversamente, l'effetto apportato sulla biosintesi di antocianine aveva la caratteristica dell'azione sinergica; infatti, la presenza della salinità riusciva a superare l'effetto inibitorio determinato dalla CO<sub>2</sub>. La cultivar verde sottoposta contemporaneamente a questi fattori ambientali avrebbe risentito in senso positivo per quanto riguarda la sintesi di entrambi i gruppi di composti fenolici. Nel caso degli acidi l'effetto che era stato giudicato come additivo sarebbe motivabile ipotizzando un'azione

compiuta in modo preponderante dal fattore CO<sub>2</sub>, laddove il sale non avrebbe fornito un grandissimo apporto; il cloruro di sodio aveva invece stimolato maggiormente la risposta da parte della pianta a sintetizzare flavonoidi, probabilmente per compensare o supplire alla mancata reazione degli acidi fenolici. La cultivar rossa, al contrario, mostrava di aver risentito in modo differente di questo duplice trattamento, sia relativamente alla sintesi di acidi fenolici che di flavonoidi, mostrando un esito di tipo antagonistico. Un discorso differente è possibile applicarlo esclusivamente alle antocianine che avevano beneficiato di un'azione sinergica, giacché l'alta CO<sub>2</sub>, di per sé, aveva dimostrato di avere un effetto inibitorio che, tuttavia, in questo contesto era stato limitato e superato dalla presenza di NaCl. Non è da escludere che in certi casi le risposte suscitate dalle presenza dei fattori ambientali protagonisti di questo trattamento non possano essere risultate in fenomeni contrastanti tra loro. Un esempio di quanto appena ipotizzato potrebbe essere la considerazione del fatto che, se da un lato una concentrazione di CO<sub>2</sub> maggiore aveva messo a disposizione delle piante una più cospicua fonte di carbonio assimilabile, dall'altro, se la reazione alla pressione osmotica esercitata dal sale nel substrato di crescita aveva comportato la chiusura stomatica, è evidente come questa abbondanza di carbonio disponibile per essere assorbito e assimilato, potesse restare inutilizzata o non sfruttata pienamente.

## 8.5 - Effetti dell'intensità luminosa e del biossido di carbonio

Per questo ultimo trattamento vale quanto osservato per il precedente, cioè che gli effetti della combinazione dei due fattori ambientali saranno confrontati con quanto compiuto dai medesimi quando agenti singolarmente. Analizzando brevemente i dati, è possibile porre in evidenza come nella sintesi di acidi fenolici la cultivar a foglia verde abbia risentito di un effetto inibitorio quando sottoposta al duplice trattamento, una condizione realizzatasi solo in questa circostanza dal momento che sia l'intensità luminosa sia la concentrazione di alta CO<sub>2</sub> avevano determinato entrambe un effetto stimolante sulla produzione di queste sostanze. In parte è da considerare che tale risultato potrebbe avere risentito di un effetto di diluizione, dal momento che la cultivar sottoposta al duplice trattamento è quella che aveva manifestato maggiore sviluppo alla raccolta essendo stata sottoposta a due fattori entrambi condizionanti il tasso fotosintetico netto. L'influenza espletata sulla sintesi di flavonoidi mostrava, invece, un differente andamento; infatti, il dato complessivo ottenuto in questa prova appare come conseguenza di un evidente effetto additivo se non addirittura sinergico dei due fattori ambientali che avevano agito simultaneamente sulla pianta. Nella lattuga a foglia rossa quello che si era rivelato un effetto di stimolo sulla sintesi di acidi fenolici da parte della CO<sub>2</sub> era significativamente contrastato dalla minore azione favorevole esercitata dall'intensità luminosa. Diversamente da quanto osservato per l'altra cultivar, in questo contesto il risultato del livello complessivo di flavonoidi mostrava di essere frutto di un effetto inibitorio operato dai due fattori in quanto non si riscontrava un significativo incremento del loro contenuto rispetto alle prove L e CO<sub>2</sub>. Infine, quanto riscontrato per le antocianine è manifestamente un effetto additivo che ha avuto la conseguenza di conciliare la tendenza inibitoria espletata della CO<sub>2</sub> su questi composti con l'accentuato stimolo alla loro biosintesi offerto dalla radiazione luminosa. La cultivar verde sottoposta a questo tipo di trattamento, sia per ciò che riguarda la sintesi di acidi fenolici che di flavonoidi, non aveva dimostrato effetti vistosamente sinergici come se i due fattori, al contrario di quando avevano operato singolarmente, non avessero

stimolato oltre un certo limite la produzione secondaria, ma avessero piuttosto favorito la crescita di biomassa del campione. La lattuga avrebbe indirizzato l'utilizzo del carbonio, reso maggiormente disponibile dalla concentrazione di CO<sub>2</sub>, verso il metabolismo primario, corroborato dall'azione stimolante della luce sul processo fotosintetico. Le ragioni che avrebbero portato ai risultati ottenuti sarebbero dunque due. In primo luogo i due fattori, incrementando il suddetto processo metabolico e fornendo al contempo il substrato su cui espletarlo, avrebbero stimolato la crescita della pianta. Essa da parte sua, avendo limitato il metabolismo secondario, di conseguenza aveva realizzato un effetto di diluizione su questi composti che non essendo stati sintetizzati in modo più cospicuo e trovandosi all'interno di un individuo di maggiori dimensioni, risultavano invariati nella quantità, se non addirittura significativamente diminuiti rispetto alle prove L e CO<sub>2</sub>. Ragionamento analogo può essere applicato alla cultivar a foglia rossa, la quale mostrava una tendenza simile per quello che concerne queste due classi di fenoli. Un risultato appena differente era presentato dalle antocianine, poiché la luce e la CO<sub>2</sub> si erano rivelate rispettivamente l'una un'importante fonte di stimolo della loro biosintesi, mentre l'altra, all'opposto, aveva manifestato un effetto di inibizione. Dunque, in questa prova la loro azione su queste molecole è stata di tipo additivo, avendo la CO<sub>2</sub> lievemente inibito l'effetto favorevole dell'intensità luminosa.

## CAPITOLO 9

### **Conclusioni**

Con la prospettiva che in un futuro non molto lontano gli effetti del cambiamento climatico possano ripercuotersi su una maggiore presenza di CO<sub>2</sub> nell'atmosfera e la concreta possibilità che un numero sempre crescente di ettari di suolo sia destinato alla desertificazione e alla salinizzazione, questo lavoro ha voluto affrontare alcune potenziali prospettive future e valutare la possibilità di sfruttare a nostro vantaggio quelli che, indipendentemente dalla nostra volontà, sono ormai dei mutamenti ineluttabili. La lattuga è stata scelta come oggetto di indagine per la sua importanza alimentare ed economica in quanto alimento consumato su larga scala in tutto il mondo e per tutto l'anno, oltre che fonte di sostanze di grande valore nutraceutico.

Il presente lavoro conferma quanto già osservato, ossia il maggiore potere antiossidante tipico delle cultivar a foglia rossa rispetto a quelle a foglia verde e verde-rossa determinato dal più alto contenuto di acidi fenolici e flavonoidi, oltre che per la presenza di antocianine, loro caratteristica esclusiva.

La capacità antiossidante delle cultivar non è risultata correlata alla specifica presenza di uno specifico composto piuttosto che un altro, essendo risultato il metabolismo fenolico molto variabile in dipendenza della cultivar e dei fattori ambientali operanti.

Nella lattuga rossa la risposta più significativa da parte degli acidi fenolici è stata evidenziata dall'acido clorogenico, la cui produzione è stata stimolata in particolar modo dall'alta concentrazione di CO<sub>2</sub>, mentre nella lattuga verde era l'acido cicorico il composto che ha risposto maggiormente ai vari fattori ambientali, soprattutto alla CO<sub>2</sub> e all'alta intensità luminosa.

I flavonoidi hanno mostrato un comportamento particolare dal momento che, oltre ai quattro composti riconosciuti come predominanti nelle due cultivar di lattuga (luteolina-7-O-glucoside, quercetina, quercetina-3-O-glucoside e

quercetina-3-O-glucuronide), in determinati trattamenti e in entrambe le cultivar assumevano particolare rilievo la luteolina (S+CO<sub>2</sub> e L+CO<sub>2</sub>) e la rutina (L e L+CO<sub>2</sub>).

A conclusione si può affermare che la lattuga, soprattutto quella a foglia rossa, ha tratto vantaggio dagli alterati fattori ambientali non mostrando alcuna diminuzione della crescita e al contempo accumulando una maggiore quantità di composti fenolici in grado di svolgere effetti benefici per la salute umana.

## BIBLIOGRAFIA

Anasori P., Ashgari G. Effect of light and differentiation of gingerol and zingiberen production in callus culture of *Zingiber officinale* Rosc. *Res. Pharm. Sci.* (2008): **3**, 59-63

Apak R., Guclu K., Demirata B., Ozyureck M., Esin C. S., Bektasoglu B., Berker K., Ozyur D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* (2007): **12**, 1496-547

Astley S. B. Dietary antioxidant past, present and future. *Trends Food Sci. Technol.* (2003): **14**, 93-98

Atoui A. K., Mansouri A., Boskou G., Kefalas P. Tea and herbal infusion: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.* (2005): **89**, 27-36

Austin M. B., Noel J. P. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natl. Prod. Rep.* (2003): **20**, 79-110

Baas W. J. Secondary Plant Compounds, Their ecological Significance and Consequences for the Carbon Budget. Introduction of the Carbon/Nutrient Theory. Causes and Consequences in Growth Rate and Productivity of Higher Plant (1989): 313-40

Baur S., Klaiber R. G., Koblo A., Carle R. Effect of different washing procedures on phenolic metabolism of shredded, packaged iceberg lettuce during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2004): **52**, 7017-25

Bazzaz F. A., Jasienski S. C., Thomas S. C., Wayne P. Microevolution responses in experimental population of plant to CO<sub>2</sub>-enriched environments: parallel results from two models system. *Proceeding of the National Academy of Science (USA)*: **92**, 8161-65



Booker F. L. Influence of carbon dioxide enrichment, ozone and nitrogen fertilization on cotton (*Gossypium hirsutum*) leaf and root composition. *Plant Cell Environ.* (2000): **23**, 573-83

Booker F. L., Mayer C. A. Atmospheric carbon dioxide, irrigation and fertilization effects on phenolic and nitrogen concentration in loblolly pine (*Pinus taeda*) needles. *Tree Physiology* (2001): **21**, 609-16

Briskin D. P., Gawienowski M.C. Differential effects of light and nitrogen on production of hypericin and leaf glands in *Hypericum perforatum*. *Plant Physiol. Biochem.* (2012): **39**, 1075-81

Bryant J.P., Chapin F. S. Klein D. R. Carbon nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos* (1983): **40**, 357-68

Caldwell C. R. Alkylperoxyl radical scavenging activity of red leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2003): **51**, 4589-95

Chalker-Scott L., Fritchigami L. H. The role of phenolic compounds in plant stress response. *Low temperatures stress physiology in crops*: **40**

Chaturvedi A. K., Vashistha R. J., Rawat N. Enrichment on Photosynthetic Behaviour of *Podophyllum hexandrum* Royle in endangered medicinal herb. *Journal of American Science* (2009): **5**, 113-8

Chen C., Pearson A. M., Gray J. I. Effect of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. *Food Chem.* (1992): **43**, 177-83

Coelho G. C., Rachwal M.F.G., Dedeczek R. A., Curcio G. R., Nietsche K., Schenkel E. P. Effect of light intensity on methylxanthine contents of *Ilex paraguariensis*. *A St. Hil. Biochem. Syst. Ecol.* (2007): **35**, 75-80

Coley P. D., Massa M., Lovelock C.E. Winter K. Effects of elevated CO<sub>2</sub> on foliar chemistry of saplings of nine species of tropical trees. *Oecologia* (2002): **133**, 62-9

Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr. Topics Med. Chem.* (2001): **1**, 569-90

Crozier A., Lean M., E. J., Mc Donald M. S. Black C. Quantitative analysis of the Flavonoid Content of Commercial Tomatoes, Onions, Lettuce and Celery. *J. Agric. Food Chem.* (1997): **45**, 590-5

Dai J., Mumper R. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* (2010): **15**, 7313-52

Daneshmand F., Arvin M. J. Kalantari K. M. Physiology responses to NaCl stress in three wild species of potato in vitro. *Acta Physiol. Plant* (2010): **32**, 91-101

Das N., Misra M., Misra A. N. Sodium chloride salt stress induced metabolic changes in callus cultures of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Journal of Plant Physiology* (1990): **137**, 244-46

Dixon R. A., Paiva N. Stress induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* (1995): **7**, 1085-97

Dupont M. S., Mondin Z., Williamson G., Price K. R. Effect of cultivar, processing and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2000): **48**, 3957-64

Elzaawely A. A., Xuan T. D., Tawata S. Essential oils, kava pyrones and phenolic compounds from leaves and rhizomess of *Alpinia zerumbet* and their antioxidant activity. *Food Chem.* (2007): **103**, 486-94

Estiarte M., Peñuelas J., Kimbal B. A., Hendrix D. L., Pinter P J. Jr, Wall G. W., La Morte R. L., Hunsaker D. J. Free-air CO<sub>2</sub> enrichment of wheat: leaf flavonoid concentration throughout the growth cycle. *Physiol. Plant.* (1999): **105**, 423-33

Felgines C., Texier O., Morand C., Manach C., Scalbert A., Regerat F., Remesy C. Bioavailability of the flavone naringenin and the glycosides in rats. *American Journal Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* (2000): **279**, 1148-54

Gazula A., Kleinhenz M. D., Streeter J. G., Miller A. R. Temperature and cultivar effects of anthocyanins and chlorophyll b concentration in three related Lollo Rossa lettuce cultivars. *Hort. Science* (2005): **40**, 1731-33

Gazula A., Kleinhenz M. D., Scheerens J. C., Ling P. P. Anthocyanin levels in nine lettuce (*Lactuca sativa*) cultivars: Influence of planting date and relations among analytic, instrumented and visual assessments of color. *Hortscience* (2007): **42**, 232-8

Ghasemzadeh A., Jaafar H. Z. E. Anticancer and antioxidant activities of Malaysian young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) varieties grown under different CO<sub>2</sub> concentrations. *J. Med. Plant Res.* (2011): **5** (14), 3247-55

Ghasemzadeh A., Jaafar H. Z. E. Effect of CO<sub>2</sub> Enrichment on Synthesis of some Primary and Secondary Metabolites in Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) *Int. Journ. Mol. Sci.* (2011): **12**, 1101-14

Ghasemzadeh A., Jaafar H. Z. E., Rahmat A., Wahab P. E. M., Halim M. R. A. Effect of different Light Intensities on Total Phenolics and Flavonoids Synthesis and Antioxidant Activities in Young Ginger Varieties (*Zingiber officinale* Rosc.) *Int. Journ. Mol. Sci* (2010): **11**

Harborne J. B. Recent advances in and functional significance of phenolic conjugation in plants. *Recent Adv. Phytochem.* (1979): **12**, 457-74

Hatier J. H. B., Gould K. S. Anthocyanin function in vegetative organs. Anthocyanins biosynthesis, function and applications. New York, NY, USA: *Springer*, 1-19

Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobylyia D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism, and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* (2002): **13**, 572-84

Heo J. W., Kang D. H., Bang H. S., Hong S.G., Chun C., Kane K. K. Early growth, pigmentation, protein content, phenylalanine ammonia-lyase activity of red curled lettuce grown under different lighting conditions. *Korean Journal Hort. Sci. Technol.* (2012): **30**, 6-12

- Hoagland D. R., Arnon D. I. The water culture method for growing plants without soil. *Circular (California Agricultural experiment station)* (1938), **347**
- Hohl U., Neubert B., Holger P., Schonhof I., Bohm H. Flavonoid concentrations in the inner leaves of head lettuce genotypes. *Eur. Food Res. Technol.* (2001): **213**, 205-11
- Hras A. R., Hadolin M., Knez Z., Bauman D. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extracts with alphatocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chem.* (2000): **71**, 229-33
- Ibrahim M. H., Jaafar H. Z. E. Impact of elevated carbon dioxide and antioxidant responses of *Eleais guineensis* Jacq. (oil palm) seedlings. *Molecules* (2012): **17**, 5195-211
- Ibrahim M. H., Jaafar H. Z. E. Primary, secondary metabolites, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, malondialdehyde and photosynthetic responses of *Ortosiphon stimaneus* Benth to different irradiance levels. *Molecules* (2012): **17**, 1159-76
- Jones C. G., Hartley S. E. A protein competition model of phenolic allocation. *Oikos* (1999): **86**, 27-44
- Takegawa K., Hattori E., Koike K., Takeda K. Induction of anthocyanin synthesis and related enzyme activities in cell cultures of *Centaurea cyanus* by UV-light irradiation. *Phytochemistry* (1991): **30**, 2271-3
- Karadge B. A. PhD Thesis submitted to Shivay University, Kolhapur, Maharashtra. (1981)
- Kleinhenz M. D., French D. G., Scheerens J. C. Variety, shading and growth stage effects on pigment concentrations in lettuce grown under contrasting temperature regimens. *Hort. Technology* (2003): **13**, 677-83
- Korner C., Norby J. M., Norby R. CO<sub>2</sub> fertilization: When? Where? How much? In Conadell et al. (eds) *Terrestrial Ecosystem in a Changing World*, Springer (2007)
- Kukic J., Petrovic S., Niketic M. Antioxidant activity of four endemic *Stachys taxa*. *Biol. Pharmaceut. Bull.* (2006): **29**, 725-9

Larsson S., Wiren A., Ericsson T., Lundgren L. Effects of light and nutrient stress on defensive chemistry and susceptibility to *Galerucella lineola* (Coleoptera Chrysomelidae) in two *Salix* species. *Oikos* (1986): **47**, 205-10

Levi-Nissim A., Kagan S., Ovadia R., Orgen-Shamir M. Effects of temperatures, UV-light and magnesium on anthocyanins pigmentation in cocoplum leaves. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* (2003): **78**, 61-64

Liang B., Huang X., Zhang G., Zhang F., Zhuo Q. Effect of lanthanum on plants under supplementary ultraviolet-B radiation: Effect of lanthanum on flavonoid contents of *Soybean* seedlings exposed to supplementary ultraviolet-B radiation. *Journ. Rare Earths* (2006): **24**, 613-6

Liu X., Ardo S., Bunning M., Parry J., Zhou K., Stushnoff C., Stoniker F., Yu L., Kendall P. Total phenolic content and DPPH\* radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado. *Science Direct* (2007): **40**, 552-7

Llorach R., Martinez-Sanchez A., Tomas-Barberan F. A., Gil M. I., Ferrers F. Characterization of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chemistry* (2008): **108**, 1028-38

Lucio M., Nunes C., Gaspar D., Ferreira H., Lima J. L. F.C., Reis S. Antioxidant activity of vitamin E and Trolox: understanding of the factors that govern lipid peroxidation studies *in vitro*. *Food Biophysics* (2009): **4**, 312-20

Lukyanova L. D., Storozheva Z. I., Proshin A. T. Corrective effect of flavonoid containing preparation extralife on the development of Parkinson's syndrome. *Bull. Exp. Biol. Med.* (2007): **144**, 42-45

Mane A. V., Karadge B. A., Samant J. S. Salinity induced changes in photosynthetic pigments and polyphenols of *Cymbopogon nardus* L. Rendle. *Journal Chem. Pharm. Res.* (2010): **2** (3), 338-47

Miladinova K., Ivanowa K., Georgieva T., Geneva M., Markovska Y. Influence of salt stress on ex vitro growth and antioxidative response of two *Paulownia* clones. (2012): Proceedings of the

International conference Ecology-Interdisciplinary science and practice”, Sofia, 25-26 October 2012. Part II. Pp 520-525

Mulagabal V., Ngouajio M., Nair A., Zhang Y., Gottumukkala A. L., Nair G. N. In vitro evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties. *Food Chemistry* (2010): **118**, 300-6

Muthukumarasamay M., Gupta S. D., Pannerselvam R. Enhancement of peroxidase, polyphenoloxidase and superoxide dismutase activities by tridimefon in NaCl stressed *Raphanus sativus* L. *Biol Plant*. (2000): **43**, 317-20

Navarro J. M., Flores P., Garrido C., Martinez V. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at ripening stages, as affected by salinity. *Food Chem*. (2006): **96**, 66-73

Neills O., Gould K. S. Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? *Functional Plant Biology* (2003): **30**, 865-73

Nguyen P. M., Niemeyer E. D. Effect of nitrogen fertilization on the phenolic composition and antioxidant properties of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal Agric. Food Chem*. (2008): **56**, 8682-91

Nicolle C., Cardinault N., Gueux E., Jaffrelo L., Rock E., Mazur A. Health effect of vegetable based diet: Lettuce consumption improves cholesterol metabolism and antioxidant status in the rat. *Clinical nutrition* (2004): **23**, 605-14

Nicolle C., Carnat A., Fraisse D., Lamaison J.-L., Rock E., Michel H., et al. Characterization and variation of antioxidant micronutrients in lettuce (*Lactuca sativa*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* (2004): **84**, 2061-69

Odabas M. S., Radiuģene J., Camas N., Janulis V., Ivanauskas L., Ćirak C. The quantitative effect of temperature and light intensity on hyperforin and hypericin accumulation in *Hypericum perforatum* L. *Journal of Medicinal Plant Research* (2009): Vol. 3 (7), 519-25

Odjegba V. J., Alokolaro A. A. Simulated drought and salinity modulates the production of Phytochemical in *Acalypha wilkesiana*. *Journal of Plant Studies* (2013): Vol. 2 (2)

Ouzounis T., Parjikolabi B. R., Freutté X., Rosenqvist E. Ottosen C. O. Predawn and high intensity application of supplemental blue light decreases the quantum yield of PSII and enhances the amount of phenolic acids, flavonoids and pigments in *Lactuca sativa*. *Frontiers in Plant Science* (2015), art. 19

Parida A. K., Das A. B., Das P. NaCl stress on photosynthetic pigments, proteins and other metabolic changes in the leaves of *Bruguiera parviflora*: studies under hydroponic culture culture conditions. *Journal Plant Biol.* (2002): **45**, 28-36

Parida A. K., Das A. B. Salt tolerance and salinity effect on plants, a review. *Ecological Environ. Saf.* (2005): **60**, 324-429

Pellegrini N., Re R., Yang M., Rice-Evans C. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruits for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decoloration assay. *Method Enzymol.* (1999): **299**, 379-89

Pennycooke J. C., Cox S., Stunshoff C. Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia. *Environ. Exp. Bot.* (2005): **53**, 225-32

Peñuelas J., Estiarte M. Can elevated CO<sub>2</sub> effect secondary metabolism and ecosystem. *Trends Ecol. Evol.* (1998): **13**, 20-4

Pérez-López U., Miranda-Apodaca J., Muñoz-Rueda A., Mena-Petite A. Lettuce production and antioxidant capacity are differentially modified by salt stress and light intensity under ambient and elevated CO<sub>2</sub>. *J. Plant Physiol.* (2013): **170**, 1517-25

Pérez-López U., Pinzino C., Quartacci M. F., Ranieri A., Sgherri C. Phenolic Composition and Related Antioxidant Properties in Differently Colored Lettuces: A Study by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Kinetics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2014): **62**, 12001-7

Petrusa L. M., Winicon I. Proline status in salt tolerant and salt sensitive alfalfa cell lines and plants in response to NaCl. *Plant Physiol. Biochem.* (1997): **35**: 303-10

Rajamane N. N., Gaikwad D. K. Effect of sodium chloride stress on polyphenol, flavonoid, anthocyanins contents and lipid peroxidation of leaflets of *Simarouba glauca*. *Indian Pharmacology and Pharmacy Research (IPPR)* (2014): **1** (2), 1-5 ISSN:235-1138

Ramakrishna A., Ravishankar G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant sign, Behav.* (2011): **6**, 1720-39

Reay P. F. The role of low temperatures in the development of the red blush of apples fruit ("Granny Smith"). *Scientia Hort.* (1999): **79**, 113-9

Reddy M. K., Alexander-Lindo R. L., Nair M. G. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2005): **52**, 9268-73

Reichardt P. B., Chapin F. S., Bryant J. P., Mates B. R., Claven T. P. Carbon nutrient balance as a predictor of plant defense in Alaskan balsam poplar: A potential of metabolic turnover. *Oecologia* (1991): **88**, 401-6

Rice-Evans C., Miller N. J., Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trend in Plant Science* (1997): **2** (4), 152-9

Rice-Evans C., Miller N. J., Bolwell P. G., Bramley P. M., Pridham J. B. The relative antioxidant activity of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* (1995): **22**, 375-83

Rice-Evans C., Miller N. J., Paganga G. Structure -antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.* (1996): **20**, 933-56

Romani A., Pinelli P., Galardi C., Sani G., Cimato A., Heimler D. Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce. *Food Chemistry* (2002): **79**, 337-42

Saha M. R., Hasan S. M. R., Akter R., Hossain R. R., Alam M. S., Alam M. A., Mazumder M. E. H. In vitro free radical scavenging activity of methanol extracts of the leaves of *Mimusops elengi* Linn. *Bangladesh J. Vet. Med.* (2008): **6**, 197-202



Sato K., Nakayama M., Shigeta J. Culturing conditions affecting the production of anthocyanin in suspended cell cultures of strawberry. *Plant Sci.* (1996): **113**, 91-8

Seelinger G., Merfort I., Wolfle U., Schempp C. M. Anti-carcinogenic effects of the flavonoid luteolin. *Molecules* (2008): **13**, 2628-51

Seigler D. S. Plant secondary metabolism. Dordrecht: Kuwar Academic Press (1998)

Sgherri C., Pinzino C., Navari-Izzo F., Izzo R., Contribution of major lipophilic antioxidants to the antioxidant activity of basil extracts: an EPR study. *J. Sci. Food Agric.* (2011): 91, 1128-34

Sharafzadeh S. Growth and secondary metabolites of basil, mint and thyme as affected by light. *International Journal of Pharma and Bio Science* (2012): Vol. 3 **Issue 1**

Shvarts M., Borochoy A., Weiss D. Low temperatures enhances petunia flower pigmentation and induces chalcone synthase gene expression. *Physiol. Plant* (1997): **99**, 67-72

Singh P. K., Shahi S. K., Sinigh A. P. Effect of salt stress on physico-chemical changes in maize (*Zea mays* L.) plants in response to salicylic acid. *Indian Journal of Plant Sciences* (2015): **Vol. 4**, 66-77

Son K. H., Park J. H., Oh M. M. Leaf shape, growth, and phytochemicals in two leaf lettuce cultivars grown under monochromatic light emitting diodes. *Korean Journal Hort. Sci. Technol.* (2012): **30**, 664-72

Stuhlfauth T., Fock H. P. Effect of whole season CO<sub>2</sub> enrichment on the cultivation of a medicinal plant, *Digitalis lanata*. *Journal of Agronomy and Crop Science.* (1990): **164**, 168-73

Tolonen M., Taipale M., Viander B., Pihlava J. M., Korhonen H., Ryhanen E. L. Plant derived biomolecules in fermented cabbage. *J. Agric. Food Chem.* (2002): **50**, 6798-803

Valentine I. K., Mana V. K., Bruno B. Phenolic cycle in plants and environment. *J. Mol Cell. Biol.* (2003): **2**, 13-18

Wang S. Y., Bunce J. A., Maas J. L. Elevated carbon dioxide increases contents of antioxidant compounds in field grown strawberries. *Journal of Agricultural and food chemistry* (2003): **51**, 4315-20

Weiss D., Halevy A. H. The role of light reactions in the regulation of anthocyanin synthesis in *Petunia* corollas. *Physiol. Plant* (1991): **81**, 127-33

Zavala J. A., Ravetta D. A. Allocation of photoassimilates to biomass, resin and carbohydrate in *Grindelia chiloensis* as affected by light intensity. *Field Crops Res.* (2001): **69**, 143-9

Zdravkovic J. M., Acamovic-Djokovic G. S., Mladenovic J. D., Pavlovic R. M., Zdravkovic M. S. Antioxidant capacity and contents of phenols, ascorbic acid, b-carotene and lycopene in lettuce. *Hem. Ind.* (2014): **68** (2), 193-8

Zlotek U., Swieca M., Jacubczyc A. Effect of abiotic elicitation on main health-promoting compounds, antioxidant activity and commercial quality of butter lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Food Chem.* (2014): **148**, 253-60

Zima T., Fialova L., Mestek O., Janebova M., Crkovska J., Malbohan I., Stipek S., Mikulikova L., Popov P. Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol related disease. *J. Biomed. Sci.* (2001): **8**, 59-70

Zobayed S., Saxena P. K. Production of St John's Wort plants under controlled environment for maximizing biomass and secondary metabolites. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant.* (2014): **40**, 108-14





